

**Charakterisierung der Acetyl-Transferase
in der Fettsäure-Synthetase aus Hefe**

Joachim Ziegenhorn

1970

CHARAKTERISIERUNG DER ACETYL-TRANSFERASE
IN DER FETTSÄURESYNTHESE AUS HEFE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Joachim Ziegenhorn
München

1970



Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 1970

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1966 bis Februar 1970 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Max-Planck-Institut für Zellchemie ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer danke ich herzlich für die Unterstützung meiner Arbeit und die wohlwollende persönliche Förderung.

Fräulein E. Ritter und Fräulein H. Walter danke ich für zeitweise Mitarbeit. Seit Mai 1969 hat mich Fräulein R. Niedermeier gewissenhaft und mit großem Fleiß unterstützt. Auch ihr gilt mein herzlicher Dank.

Herrn Dr. E. Wunsch und Herrn K. Deimer, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, danke ich für die Herstellung der Tripeptide Gln-Ser-Gly und N-Acetyl-Ser-Gln-Gly und Herrn Dr. F. Keller, Riker Laboratories, Northridge/USA, für die Überlassung von γ -Dimethylamino- β -hydroxybuttersäure.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Ergebnisse	6
I. Wirkung von Malonyl-Coenzym A auf die Fettsäuresynthetase	6
1. Geschwindigkeit und Ausmaß der Inaktivierung	7
2. Reversibilität der Inaktivierung	8
3. Untersuchungen über die Ursachen der Inaktivierung	9
4. Diskussion	12
II. Wirkung von SH-Giften auf Enzymkomponenten der Fettsäure- synthetase	12
1. Acetyl-Transferase	13
2. Malonyl-Transferase	14
3. β -Ketoacyl-Reduktase	15
4. β -Hydroxyacyl-Dehydratase	17
5. α, β -Dehydroacyl-Reduktase	18
6. Palmityl-Transferase	19
7. Zusammenhang zwischen den Einzelaktivitäten und der Gesamtaktivi- tät des Multienzymkomplexes	20
8. Diskussion	21
III. Charakterisierung der Acetyl-Transferase in der Fettsäure- synthetase	25
1. Markierung der Akzeptorgruppe	26
2. Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms mit Pepsin und Trennung der Spaltprodukte	30
a) Spaltung	31
b) Trennungsgang für die Spaltprodukte	32
3. Aminosäurezusammensetzung der peptischen [^{14}C]Acetyl-Peptide ..	40
4. Carnitin als möglicher Acetyl-Akzeptor der Transferase	42
a) Stabilität des Carnitins	43
b) Isolierung von Carnitin aus einem Proteinhydrolysat	44
c) Abwesenheit von L-Carnitin in der Fettsäuresynthetase	45
5. Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms mit Trypsin und Trennung der Spaltprodukte	47

	Seite
a) Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms und Vortrennung der Peptidgemische	47
b) Auftrennung der einzelnen Peptidgemische	52
6. Struktur des tryptischen [^{14}C]Acetyl-Peptids T_3 und seine Position in der Sequenz des Enzyms	58
a) Aminosäurezusammensetzung des Peptids und seine Position in der Enzymsequenz	58
b) Sequenz des Peptids	61
7. Identifizierung der Akzeptorgruppe und Teilstruktur für das Enzym	72
a) $\text{O} \rightarrow \text{N}$ -Acetylmagerung	72
b) Kinetische Analyse	73
c) Teilstruktur für das Enzym	77
8. Untersuchungen zur Struktur des tryptischen [^{14}C]Acetyl-Peptids T_4	83
9. Diskussion	87
C. Experimenteller Teil	90
I. Allgemeines	90
1. Geräte	90
2. Materialien	91
3. Allgemeine analytische Methoden	92
a) Proteinbestimmung	92
b) Radioaktivitätsbestimmung	92
c) Thioesterbestimmung	92
d) Mercaptanbestimmung	92
4. Isolierung und Bestimmung von Fettsäuresynthetase	93
II. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel B, I	93
1. Inkubation der Fettsäuresynthetase mit Malonyl-CoA	93
2. Rückisolierung von Fettsäuresynthetase nach der Inkubation mit Malonyl-CoA	94
a) Ammonsulfat-Fällung	94
b) Gelfiltration	94
III. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel B, II	94
1. Hemmung der Fettsäuresynthetase durch SH-Reagenzien	94
a) NÄM-Hemmung	94

	Seite
b) JAA-Hemmung	95
2. Bestimmung von Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase	95
a) Acetyl-Transferase	95
b) Malonyl-Transferase	96
c) β -Ketoacyl-Reduktase	96
d) β -Hydroxyacyl-Dehydratase	97
e) α,β -Dehydroacyl-Reduktase	98
f) Palmityl-Transferase	98
IV. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel B, III	98
1. Isolierung von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase	98
2. Spaltung von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase durch proteolytische Enzyme	99
a) Peptische Spaltung	99
b) Tryptische Spaltung	100
3. Trennverfahren für Peptide und Aminosäuren	100
a) Chromatographie an Ionenaustauschern	100
b) Gelfiltration	101
c) Papierelektrophorese	102
d) Papier- und Dünnschichtchromatographie	103
4. Aminosäureanalyse	104
5. Endgruppenbestimmung und Sequenzanalyse	105
a) Aminoendgruppenbestimmung mit Dansylchlorid	105
b) Edman-Abbau	106
c) Abbau mit Leucinaminopeptidase	106
d) Abbau mit Carboxypeptidase A	106
6. Darstellung von Pyrrolidonyl-(0-[^{14}C]acetyl)seryl-glycin	107
7. Hydrolyse von Fettsäuresynthetase zur Ermittlung ihres Carnitin-Gehalts	109
8. Peroxydation von harnstoff-denaturierter [^{14}C]Acetyl-Fettsäuresynthetase	109
9. Verseifung der [^{14}C]Acetyl-Peptide und des denaturierten [^{14}C]Acetyl-Enzyms	109
10. Tryptische Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Peptids P ₁	110
D. Zusammenfassung	111
E. Literaturverzeichnis	113

Verwendete Abkürzungen:

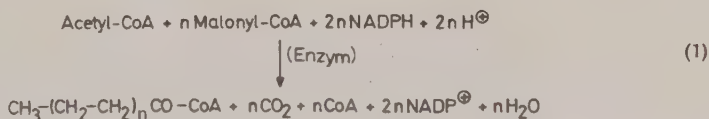
An	Anion
ACP	"acyl carrier protein"
C _{1,2} , . . .	durch Carboxypeptidase A-Abbau entstandene [¹⁴ C]Acetyl-Peptide
CM	Carboxymethyl-Rest
CoA, CoA-SH	Coenzym A
CPA	Carboxypeptidase A
Dansyl	1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-Rest
DCC	Diphenylcarbamoylechlorid
DEAE	Diäthylaminoäthyl-Rest
DFP	Diisopropylfluorphosphat
E	Einheit
ΔE	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EH	Enzym
Enzym $\begin{smallmatrix} \text{SH}_z \\ \text{SH}_p \end{smallmatrix}$, Enzym $\begin{smallmatrix} \text{SH} \\ \text{YH} \end{smallmatrix}$	Fettsäuresynthetase
FMN	Flavinmononucleotid
GSH	Glutathion
IpM	Impulse pro Minute
JAA	Jodacetamid
Ka	Kation
k	kristallisierte Fettsäuresynthetase
m	elektrophoretische Mobilität
NADP ⁺	Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat, oxydiert
NADPH	Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat, reduziert
NÄM	N-Äthylmaleinimid
P _{1,2} , . . .	peptische [¹⁴ C]Acetyl-Peptide
PC (A,B, . . .)	Papierchromatographie mit Laufmittel A,B, . . .
PE	Papierelektrophorese
aM <u>Pyridin-Formiat</u>	Pyridiniumformiat-puffer, a molar an Formiat
bM <u>Pyridin</u> -Formiat	Pyridiniumformiat-puffer, b molar an Pyridin
R _f	R _f -Wert

SE	Sulfoäthyl-Rest
T _{1,2} , . . .	tryptische [¹⁴ C]Acetyl-Peptide
TCE	Trichloressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
V _i	inneres Volumen einer Sephadex-Gelpackung
V _o	äußeres Volumen einer Sephadex-Gelpackung

A. Einleitung

Der Aufbau langkettiger gesättigter Fettsäuren in der belebten Natur vollzieht sich durch wiederholte Anlagerung von C_2 -Einheiten aus Malonyl-Coenzym A an ein "Starter"-Acetyl-Coenzym A (Lit. 1-6). Bei der Durchführung dieser Synthese bedient sich die Natur einer wirkungsvollen Technik. Alle für die Katalyse der Teilschritte des Fettsäureaufbaus erforderlichen Enzyme sind auf engstem Raum zu mehr oder weniger stabilen Komplexen zusammengefügt. Die Rohstoffe zur Synthese werden von außen in die Enzymaggregate eingespeist und mit Hilfe eines zentralen Transportsystems von Reaktionszentrum zu Reaktionszentrum befördert. Die Zwischenprodukte verlassen die Enzymsysteme nicht, erst die fertigen Endprodukte werden ausgestoßen.

Im letzten Jahrzehnt wurden aus zahlreichen Organismen derartige, als "Fettsäuresynthetasen" bezeichnete Multienzymkomplexe isoliert (Lit. 5-11). Allen bisher untersuchten Enzymsystemen ist gemeinsam, daß sie dieselbe, in Gl. (1) summarisch zusammengefaßte Reaktionsfolge katalysieren, wobei lediglich Unterschiede bestehen, ob - wie in den Enzymkomplexen aus tierischem Gewebe und Pflanzen - die freien Fettsäuren oder - wie im Hefeenzym - die Coenzym A-Derivate der Fettsäuren gebildet werden (Lit. 12, 10, 7).



Die chemischen Einzelheiten des Syntheseprozesses wurden zuerst von Lynen (Lit. 5, 6) beim Studium der Fettsäuresynthetase aus Hefe aufgeklärt. Die Synthetase aus Hefe (Molekulargewicht $2,3 \cdot 10^6$) besteht aus einem stabilen Aggregat mehrerer Subkomplexe, von denen jeder für sich alle Teilenzyme zur Fettsäuresynthese besitzt (Lit. 13, 18). Im Zentrum einer solchen funktionellen Einheit befindet sich ein sinnvolles Transportsystem, welches für den reibungslosen Ablauf der Synthese sorgt. Es besteht aus einem langen, beweglichen Arm, an dessen freies Ende Substrate und Zwischenprodukte gebunden und von einer enzymatischen Wirkungsstelle zur anderen transportiert werden (Abb. 1, S. 2). Die Akzeptorgruppe des flexiblen Armes wurde von Lynen (Lit. 15) als Sulfhydrylgruppe identifiziert und "zentrale" SH-Gruppe genannt. Die Struktur des Dreharmes klärten Vagelos (Lit. 16) und Wakil (Lit. 17) am fettsäuresynthetisierenden

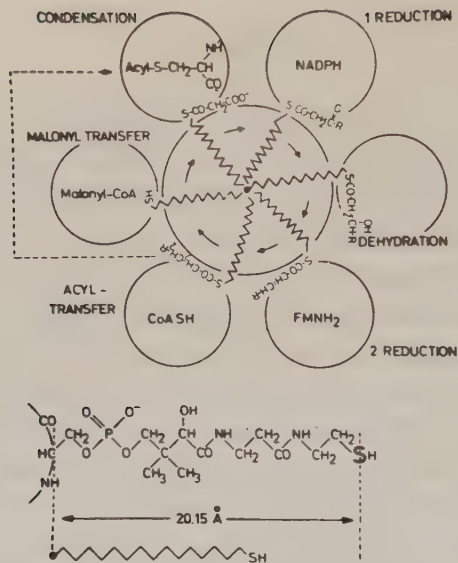


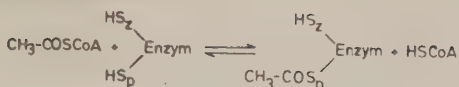
Abb. 1. Schema für den Ablauf der Fettsäuresynthese in einer funktionellen Einheit der Fettsäuresynthetase aus Hefe (nach Lit. 18, 19) .

Enzymsystem aus *Escherichia coli* auf. Es handelt sich um ein Pantetheinmolekül, das über eine Phosphatbrücke mit einem Serinrest eines als "acyl carrier protein" (ACP) bezeichneten Strukturelements des Komplexes verknüpft ist. Die Existenz einer derartigen "acyl carrier protein"-Komponente konnte auch für das Hefeenzym und für verschiedene andere Fettsäuresynthetasen nachgewiesen werden (Lit. 18, 20, 21).

Die einzelnen Stationen, die die Substrate Malonyl-Coenzym A und Acetyl-Coenzym A und ihre Folgeprodukte auf dem Wege zu den Endprodukten Palmityl-Coenzym A und Stearyl-Coenzym A durchlaufen, sind in Abb. 2 zusammengefaßt. Die Synthese wird durch die Übertragung eines Acetylrestes von Acetyl-Coenzym A auf eine als "peripher" bezeichnete SH-Gruppe im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzym gestartet (Lit. 13). Es folgt die Übertragung des Malonylrestes von Malonyl-Coenzym A auf die "zentrale" SH-Gruppe am Transportarm. Im nächsten Reaktionsschritt kondensieren Acetyl- und Malonylrest unter Decarboxylierung. Der hierbei gebildete Acetacetylrest wird anschließend mit verschiedenen Enzymen in Kontakt gebracht, welche ihn über eine Reduktion, eine Dehydatisierung und eine weitere Reduktion in den Butyrylrest überführen. Nach Erreichung dieses Stadiums gibt der Transportarm den Butyryl-

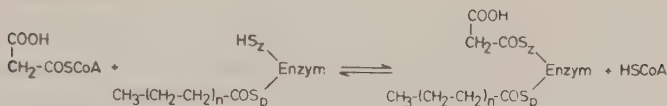
Startreaktion:

Acetyl-Transfer:

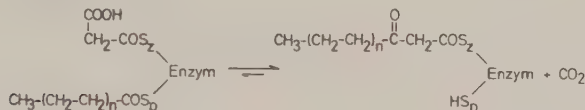


Kettenverlängerung:

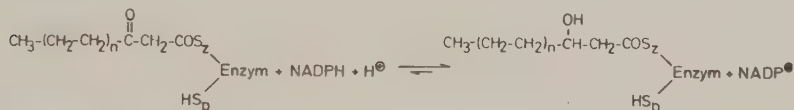
1) Malonyl-Transfer:



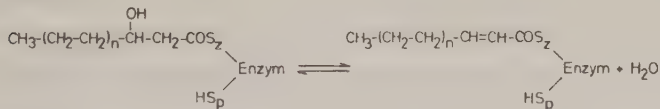
2) Kondensation:



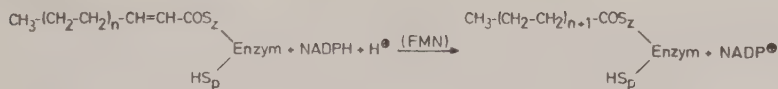
3) 1. Reduktion:



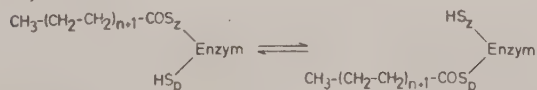
4) Dehydratation:



5) 2. Reduktion:



6) Acyl-Transfer:



Abschlußreaktion

Palmityl-Transfer

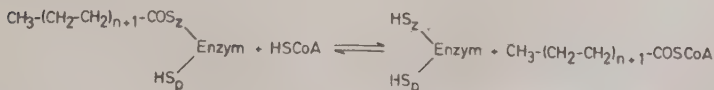


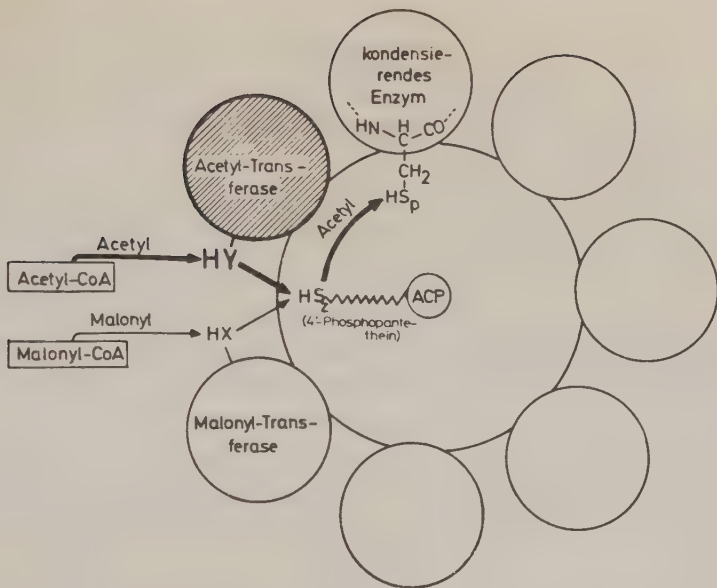
Abb. 2. Die chemischen Reaktionen der Fettsäuresynthese (nach Lit. 6, 13).

HS_z^- = "zentrale" SH-Gruppe, HS_p^- = "periphere" SH-Gruppe.

rest an die "periphere" SH-Gruppe ab und nimmt einen zweiten Malonylrest auf, der nun in einer erneuten zyklischen Reaktionsfolge um den Butyrylrest verlängert wird. Dieser Syntheseprozess setzt sich so lange fort, bis die Kette eine Länge von 16-18 C-Atomen erreicht hat. Ist das der Fall, dann werden die langkettigen Säurereste vom Transportarm abgelöst und in der abschließenden Reaktion auf Coenzym A übertragen.

Neuere Untersuchungen an der Fettsäuresynthetase aus Hefe im Münchener Laboratorium erbrachten Anhaltspunkte dafür, daß das Hefeenzym außer den an den Reaktionen der Kettenverlängerung beteiligten Enzymen als weitere Bestandteile Enzymkomponenten enthält, welche die Funktion haben, die Bausteine zur Fettsäuresynthese aus den Substraten auf das zentrale Transportsystem zu übertragen. Schweizer (Lit. 18, 22) konnte nachweisen, daß der Enzymkomplex neben den reaktiven SH-Gruppen Akzeptorgruppen besitzt, die Malonyl- und Acetylreste kovalent, jedoch nicht als Thioester binden. Auch die nicht-thioesterartig gebundenen Acylreste stehen für die Fettsäuresynthese zur Verfügung. Diese und andere Befunde führten Lynen und Schweizer (Lit. 18, 22) zu der Annahme, daß die Acylreste zunächst von einer als "HX"-Gruppe bezeichneten Wirkstelle einer Enzymkomponente des Komplexes aufgenommen werden. Erst von dieser Wirkgruppe werden der Malonyl- und der Acetylrest in ihre Startpositionen, die "zentrale" und "periphere" SH-Gruppe, übertragen. Für den Acetylrest konnte nachgewiesen werden, daß er dabei nicht unmittelbar von der "HX"-Gruppe zur "peripheren" SH-Gruppe gelangt, sondern daß dies vermittels des zentralen Transportarmes geschieht (Lit. 18, 23). Nach Isolierung zweier serin-haltiger [^{14}C] Malonyl-Peptide aus dem peptischen Hydrolysat des mit radioaktiver Malonsäure beladenen Enzymkomplexes wurde vermutet, daß die "HX"-Gruppe mit der Hydroxylgruppe eines Serinrestes identisch ist. Spätere Untersuchungen von Oesterheld (Lit. 23, 19) über die Verteilung der Malonyl- und Acetylreste auf die verschiedenen Substratbindungsstellen des Enzymkomplexes sowie über dessen Deacylase-Aktivität lieferten Hinweise, daß Malonyl- und Acetyl-Transfer nicht über ein und dieselbe, sondern über zwei verschiedene Enzymkomponenten mit den Wirkgruppen "XH" bzw. "-YH" ablaufen. In der unterschiedlichen, den Transferasen zugeschriebenen Deacylasewirkung der Fettsäuresynthetase gegenüber Methylmalonyl-Coenzym A und Acetyl-Coenzym A wurde ein Anzeichen für die Existenz zweier verschiedener Transferasen gesehen.

Die vorliegenden gesicherten Befunde und die noch zu untermauernden Hypothesen über den Ablauf der Startreaktionen bei der Fettsäuresynthese im Hefeenzym veranschaulicht Abb. 3.



Multienzymkomplex

Abb. 3. Hypothetischer Verlauf der Startreaktionen bei der Fettsäuresynthese im Multienzymkomplex aus Hefe.

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Enzymkomponente der Fettsäuresynthetase zu charakterisieren, welche die Übertragung des Acetylrestes katalysiert. Im Zusammenhang damit war zu prüfen, ob Acetyl- und Malonylgruppe von verschiedenen Komponenten des Enzymkomplexes übertragen werden.

Daneben wurden Veränderungen studiert, die sich bei der Einwirkung von Malonyl-Coenzym A auf die Fettsäuresynthetase abspielen. Des weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob außer dem kondensierenden Teilenzym noch andere Enzymkomponenten des Komplexes am katalytischen Prozeß der Fettsäuresynthese beteiligte SH-Gruppen enthalten.

B. Ergebnisse

I. Wirkung von Malonyl-Coenzym A auf die Fettsäuresynthetase

Die enzymatische Aktivität der Fettsäuresynthetase läßt sich nach Gl. (1), S. 1, durch Messung der Geschwindigkeit des NADPH-Verbrauchs bei der Fettsäuresynthese bestimmen (Lit. 7). Es war seit längerem bekannt, daß die auf diese Weise ermittelte Aktivität des Enzyms von der Reihenfolge der Zugabe der Substrate Acetyl- und Malonyl-CoA abhängt (Lit. 24). Vorinkubation des Enzyms mit Acetyl-CoA und Start der Fettsäuresynthese durch Zugabe von Malonyl-CoA bewirken ein unmittelbares lineares Anlaufen der Reaktion sowie eine große Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 4, Kurve I). Das Bild ändert sich nicht wesentlich, wenn mit einem Gemisch von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA gestartet wird (Abb. 4, Kurve II); lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit ist $10 \pm 5\%$ niedriger. Ein anderer Sachverhalt ergibt sich jedoch, wenn das Enzym mit Malonyl-CoA vorinkubiert und die Fettsäuresynthese mit Acetyl-CoA gestartet wird (Abb. 4, Kurve III). Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß sich die Anwesenheit des Malonyl-CoA vor dem Start bemerkbar macht durch 1. eine Veränderung des zeitlichen Verlaufs der Reaktion - vor dem Beginn der linearen Extinktionsabnahme

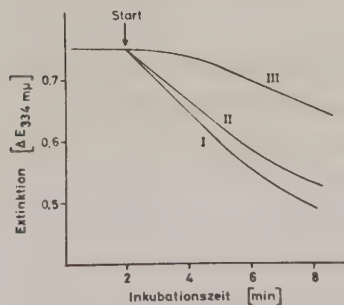


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der NADPH-Oxydation bei der Fettsäuresynthese.

Kurve I: Start mit Malonyl-CoA nach 3 min Vorinkubation mit Acetyl-CoA;

Kurve II: Start mit einem Gemisch von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA;

Kurve III: Start mit Acetyl-CoA nach 3 min Vorinkubation mit Malonyl-CoA. Der Reaktionsansatz enthielt jeweils 5,7 μg Enzym. Weitere Einzelheiten s. Experimenteller Teil, S. 93.

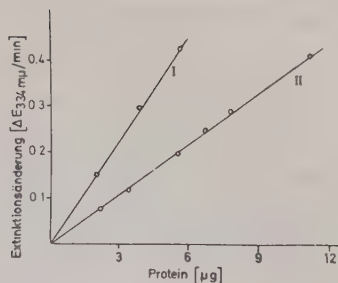


Abb. 5. Geschwindigkeit des NADPH-Verbrauchs in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge.

Kurve I: Start mit Malonyl-CoA nach 3 min Vorinkubation mit Acetyl-CoA;

Kurve II: Start mit Acetyl-CoA nach 3 min Vorinkubation mit Malonyl-CoA.

Einzelheiten s. Experimenteller Teil, S. 93.

wird eine deutliche Verzögerungsphase beobachtet – und 2. durch eine geringere Maximalgeschwindigkeit der NADPH-Oxydation. Die Maximalgeschwindigkeit ist auch in diesem Falle der eingesetzten Enzymmenge proportional (Abb. 5, Kurve II).

Die beobachtete geringere Aktivität des Enzyms nach Einwirkung von Malonyl-CoA konnte als ein Anzeichen dafür gewertet werden, daß Malonyl-CoA bei längerer Einflußnahme auf das Enzym in Abwesenheit von Acetyl-CoA eine Inhibitorwirkung auszuüben vermag (Abb. 6).

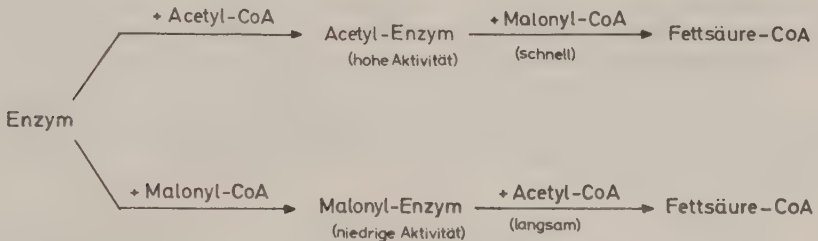


Abb. 6. Wirkung von Malonyl-CoA auf die Fettsäuresynthetase.

Es wird über die Ergebnisse von Untersuchungen berichtet, die zur Aufklärung der Ursachen der schädigenden Wirkung von Malonyl-CoA auf die Fettsäuresynthetase durchgeführt wurden.

1. Geschwindigkeit und Ausmaß der Inaktivierung

Die Untersuchungen galten zunächst der Frage nach der Geschwindigkeit, mit der die Inaktivierung des Enzyms durch Malonyl-CoA herbeigeführt wird.

Reeves (Lit. 25) hatte festgestellt, daß die Aktivität des Enzyms unabhängig von der Vorinkubationszeit mit Malonyl-CoA ist. Diese Beobachtung konnte nicht bestätigt werden. Wie Abb. 7 zu entnehmen ist, erleidet das Enzym unter dem Einfluß von Malonyl-CoA eine rasche, aber durchaus noch erfäßbare Veränderung, welche sich in einer Aktivitätsabnahme bemerkbar macht. Mit dem Absinken der Aktivität ist eine ebenso rasche Zunahme der Induktionsphase gekoppelt (Abb. 8).

Ist der Gleichgewichtszustand in bezug auf die Inhibitorwirkung des Malonyl-CoA erreicht, so beträgt die Aktivität des Enzyms nur noch $50 \pm 9\%$ (Mittelwert aus zahlreichen Messungen) der ursprünglichen Aktivität.

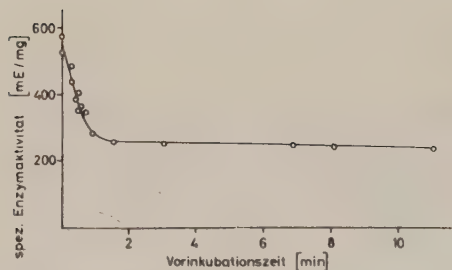


Abb. 7. Abhängigkeit der Aktivität der Fettsäuresynthetase von der Vorinkubation mit Malonyl-CoA.

Spezif. Aktivität des eingesetzten Enzympräparats: 628 mE/mg (bei Start mit Malonyl-CoA). Einzelheiten s. Experimenteller Teil, S. 93.

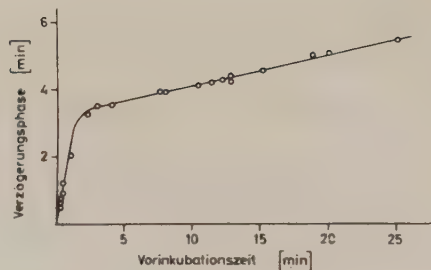


Abb. 8. Abhängigkeit der Verzögerungsphase von der Dauer der Vorinkubation des Enzyms mit Malonyl-CoA.

Verzögerungsphase = Zeit zwischen dem Start der Reaktion und dem Beginn des linearen Teils der Kinetik. Ansatz wie bei Abb. 7.

2. Reversibilität der Inaktivierung

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von Malonyl-CoA auf die Fettsäuresynthetase wurde untersucht, ob Malonyl-CoA eine reversible oder eine irreversible Schädigung des Enzyms verursacht. Irreversibilität der Hemmung sollte dann vorliegen, wenn die ursprüngliche Aktivität des Enzyms nach der Abtrennung des Malonyl-CoA und der daraufhin zu erwartenden spontanen Abspaltung der enzymgebundenen Malonsäure (Lit. 26) nicht wieder zurückerhalten wird.

Zur Behandlung dieses Problems wurden die folgenden Methoden benutzt:

1. Entfernung des Malonyl-CoA aus dem Inkubationsgemisch mit Hilfe einer Gelfiltration,
2. Abtrennung des Enzyms von Malonyl-CoA durch Fällung mit Ammonsulfat.

In Tab. 1 sind die Ergebnisse mehrerer Versuche zusammengestellt. Die Daten belegen, daß nach beiden Verfahren mit der Abtrennung des Malonyl-CoA eine weitgehende Wiederherstellung der Aktivität des Enzyms verbunden ist. Nach einem Zusatz von Malonyl-CoA wurde wieder die frühere Hemmwirkung beobachtet. Die bisherigen Versuchsergebnisse sprechen also gegen eine irreversible Inhibition der Fettsäuresynthetase durch Malonyl-CoA.

Tabelle 1. Reaktivierung des Enzyms durch Abtrennung des Malonyl-CoA.

Trennmethode	% Reaktivierung
Gelfiltration	88% ^a
Gelfiltration	98% ^a
Gelfiltration	87% ^a
Ammonsulfat- -Fällung	100% ^b
Ammonsulfat- -Fällung	112% ^b

^a bezogen auf Ausgangsaktivität vor der Hemmung.

^b bezogen auf einen Vergleichsansatz.

Einzelheiten vgl. Experimenteller Teil, S. 94.

3. Untersuchungen über die Ursachen der Inaktivierung

Zunächst mußte geklärt werden, ob die beschriebenen Wirkungen dem Malonyl-CoA selbst, oder möglicherweise einer im Präparat enthaltenen Verunreinigung zuzuschreiben waren.

Wie eine Wiederholung des Versuches von Abb. 4, S. 6, unter Verwendung von gereinigtem [2-¹⁴C]Malonyl-CoA zeigte (zur Reinigung von [2-¹⁴C]Malonyl-CoA s. Experimenteller Teil, S. 91), dürfte eine Verunreinigung als Ursache ausscheiden. Es bot sich dasselbe Bild, wie es bei Verwendung von ungereinigtem Malonyl-CoA erhalten wurde.

Im Verlauf der weiteren Untersuchung wurde das Verhalten des inaktivierten Enzyms in der analytischen Ultrazentrifuge studiert. Es interessierte hierbei die Frage, ob die beobachtete geringere Aktivität des Enzyms nach Einwirkung von Malonyl-CoA auf einer Spaltung des Enzymkomplexes beruhte. Die Spaltung des Komplexes sollte sich am Auftreten langsamer sedimentierender Bruchstücke zu erkennen geben. Abb. 9 zeigt, daß die Sedimentation des Enzyms durch Malonyl-CoA nicht beeinflusst wurde. Die Aktivitätsabnahme war somit nicht auf eine Dissoziation des Komplexes zurückzuführen.

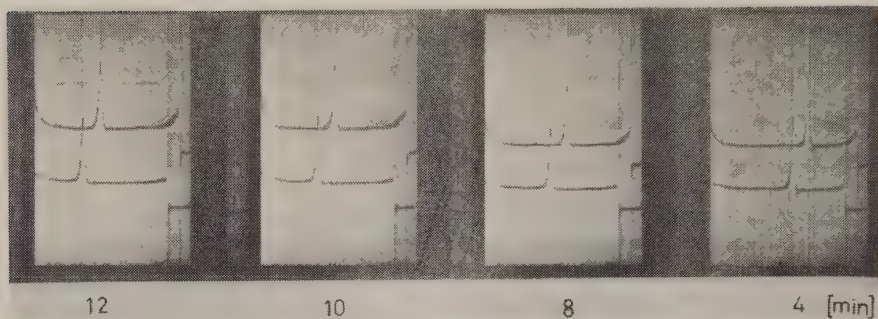


Abb. 9. Sedimentation von Fettsäuresynthetase in Gegenwart von Malonyl-CoA.

Die Aufnahmen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Erreichen der Arbeitsgeschwindigkeit (52640 UpM) gemacht. Temperatur: 9°C.

oben: 3,59 mg/ml Enzym (280 mE/mg bei Start mit Acetyl-CoA), 6,2 mM Malonyl-CoA, 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5.

unten: 3,59 mg/ml Enzym (650 mE/mg bei Start mit Malonyl-CoA), 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5.

Metallionen sind an dem Zustandekommen der Hemmung des Enzyms wahrscheinlich nicht beteiligt. Ein Zusatz von K-ÄDTA ($1 \mu\text{Mol/m}$) zur Inkubationsmischung verursachte keine Veränderung der beschriebenen Effekte. Bei größeren Konzentrationen an K-ÄDTA wurde jedoch eine Erhöhung der Geschwindigkeit des NADPH-Verbrauchs, verbunden mit einer von Anfang an linearen Kinetik, beobachtet (Abb. 10 und Abb. 11). Damit konnte eine schon von Reeves (Lit. 25) gemachte Feststellung im wesentlichen bestätigt werden.

Der Komplexbildner wirkte in ähnlicher Weise wie Coenzym A (Lit. 24). Auch diese Verbindung verursachte mit zunehmender Konzentration zunächst eine Begradigung der Kinetik und steigerte erst in höheren Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit in stärkerem Maße (Abb. 12). Coenzym A entfaltete diese Wirkung jedoch schon in wesentlich niedriger Konzentration als K-ÄDTA.

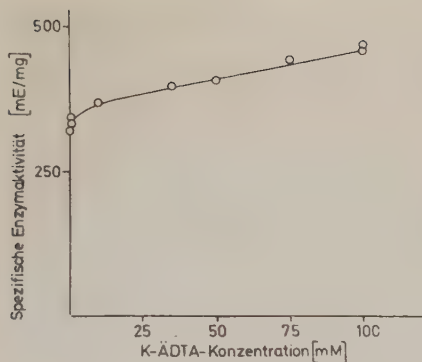


Abb. 10. Aktivität der Fettsäuresynthetase in Abhängigkeit von der K-ÄDTA-Konzentration.

Das Enzym (610 mE/mg bei Start mit Malonyl-CoA) wurde 3 min mit einem Gemisch von Malonyl-CoA und K-ÄDTA vorinkubiert. Start mit Acetyl-CoA. Weitere Einzelheiten s. Exp. Teil, S. 93.

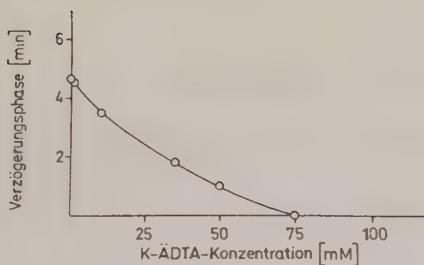


Abb. 11. Abhängigkeit der Verzögerungsphase von der K-ÄDTA-Konzentration.

Ansatz wie bei Abb. 10.

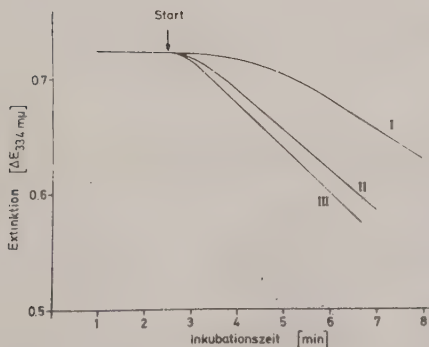


Abb. 12. Zeitlicher Verlauf der NADPH-Oxydation bei der Fettsäuresynthese in Gegenwart von Coenzym A.

6 μ g Enzym wurden 3 min mit einem Gemisch von Malonyl-CoA und CoA vorinkubiert.

Start mit Acetyl-CoA.

Kurve I: ohne CoA;

Kurve II: $5 \cdot 10^{-5}$ M CoA;

Kurve III: $8 \cdot 10^{-5}$ M CoA.

Weitere Einzelheiten s. Exp. Teil, S. 93.

4. Diskussion

Für das Zustandekommen der beobachteten Verzögerungsphase ist wahrscheinlich die Besetzung der zentralen SH-Gruppe des Enzyms durch Malonylreste verantwortlich. Wie in der Einleitung geschildert wurde, kann die Fettsäuresynthese nur anlaufen, nachdem ein Essigsäuremolekül vom 4'-Phosphopantethein des ACP in das aktive Zentrum des kondensierenden Teilenzym befördert worden ist. Diese Startreaktion ist nicht möglich, wenn der Transportarm mit einem Malonylrest besetzt ist. Erst nach der Verdrängung des Malonylrestes durch einen Acetylrest wird für letzteren der Weg zur Startposition frei, und die Fettsäuresynthese kommt in Gang. Warum hierbei nicht mehr die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird, in welcher Weise also Malonyl-CoA die Fettsäuresynthese "bremst", ohne dabei, wie im Vorstehenden gezeigt wurde, im Enzym irreversible Veränderungen zu verursachen, müssen weitere Versuche klären.

II. Wirkung von SH-Giften auf Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase

Für die enzymatische Aktivität der Fettsäuresynthetase sind SH-Gruppen von Bedeutung, denn Schwefelgifte wie Jodacetamid (JAA) oder N-Äthylmaleimid (NÄM) unterbinden die Fettsäuresynthese vollständig (Lit. 6, 23). Um festzustellen, ob der Multi-enzymkomplex außer den bislang bekannten reaktiven SH-Gruppen des ACP und des kondensierenden Teilenzym noch weitere am katalytischen Prozeß beteiligte Sulfhydrylgruppen enthält, studierten wir den Einfluß von JAA und NÄM auf die Enzymkomponenten des Komplexes. Die Wirkungsweise dieser SH-Reagenzien veranschaulicht Abb. 13.

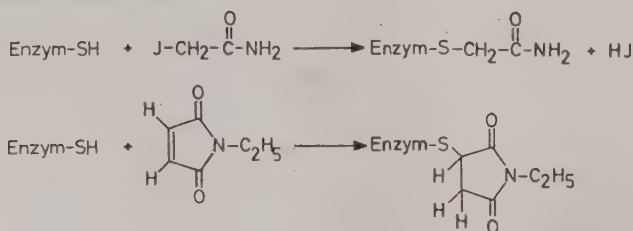


Abb. 13. Blockierung von "SH-Enzymen" durch JAA und NÄM.

Das Enzym katalysiert die Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-CoA auf Pantethein, welches das natürliche, am "acyl carrier protein" gebundene 4'-Phosphopantethein in dessen Eigenschaft als Empfänger des Acetylrestes vertritt. Die Geschwindigkeit der Übertragung wird als ein Maß für die Aktivität des Acetyl-Transferase-Enzyms des Komplexes angesehen.

Wir untersuchten mit obiger Modellreaktion die Hemmbarkeit der Transferase durch NÄM und JAA. Aus den in Abb. 15 wiedergegebenen Versuchsergebnissen geht hervor, daß weder NÄM noch JAA das Enzym hindern, die Übertragung der Essigsäure zu katalysieren. Daraus ist zu schließen, daß an der Katalyse der Modellreaktion keine durch diese SH-Reagenzien hemmbare Sulfhydrylgruppen beteiligt sind.

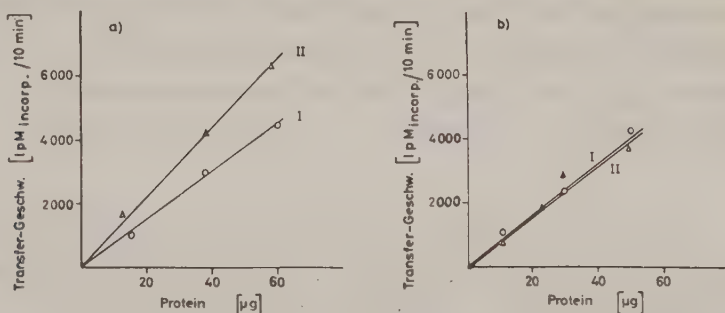


Abb. 15. Wirkung von SH-Giften auf die Aktivität der Acetyl-Transferase.

Abb. 15 a. Wirkung von 10^{-2} M NÄM.

Kurve I (○—○): Enzym vor NÄM-Behandlung (350 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);

Kurve II (△—△): Enzym nach NÄM-Behandlung (8 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

Abb. 15 b. Wirkung von 10^{-2} M JAA.

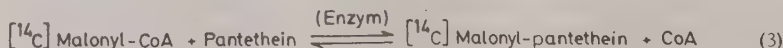
Kurve I (○—○): Enzym vor JAA-Behandlung (643 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);

Kurve II (△—△): Enzym nach JAA-Behandlung (7 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

Einzelheiten s. Experimenteller Teil, S. 94, 95.

2. Malonyl-Transferase

Zur Bestimmung der Malonyl-Transferase läßt sich die durch Gl. (3) beschriebene Übertragungsreaktion heranziehen (Lit. 6, 27):



Die Aktivität des Enzyms wird durch die Geschwindigkeit, mit welcher es den Malonyl-rest auf Pantethein überträgt, charakterisiert.

Nach Angaben von Kirschner (Lit. 24) läßt sich die Malonyl-Transferase durch JAA zu 61 % hemmen. Versuche von Hagen (Lit. 27) sowie eigene Messungen konnten diesen Befund nicht bestätigen. Weder mit JAA noch mit NÄM wurde eine Hemmung beobachtet (Abb. 16). Diese Resultate lassen den Schluß zu, daß an der Katalyse der Übertragung der Malonsäure von CoA auf Pantethein keine durch NÄM oder JAA hemmbare SH-Gruppen teilnehmen.

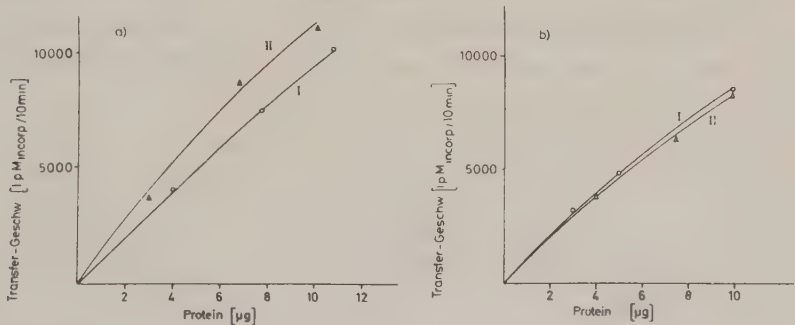


Abb. 16. Wirkung von SH-Giften auf die Aktivität der Malonyl-Transferase.

Abb. 16 a Wirkung von 10^{-2} M NÄM.

Kurve I (o—o): Enzym vor NÄM-Behandlung (600 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);
Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach NÄM-Behandlung (24 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

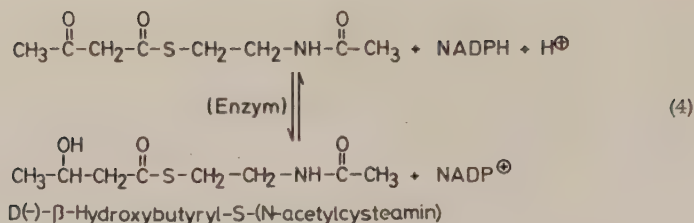
Abb. 16 b Wirkung von 10^{-2} M JAA.

Kurve I (o—o): Enzym vor JAA-Behandlung (624 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);
Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach JAA-Behandlung (20 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

Einzelheiten s. Experimenteller Teil, S. 94, 96.

3. β -Ketoacyl-Reduktase

Als Modellsubstrat für die Bestimmung der β -Ketoacyl-Reduktase dient S-Acetacetyl-N-acetylcystamin (Lit. 6). Die Geschwindigkeit der Reduktion dieser Verbindung durch das Enzym [Gl. (4)] kennzeichnet dessen Aktivität.



Die Enzymabhängigkeiten, die unter Verwendung von NÄM- und JAA-behandelten Enzymen gemessen wurden, sind in Abb. 17 wiedergegeben. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wurde die Modellreaktion durch NÄM und JAA nicht beeinflusst. Das bedeutet, daß am katalytischen Prozeß keine durch diese Inhibitoren hemmbare SH-Gruppen beteiligt sind.

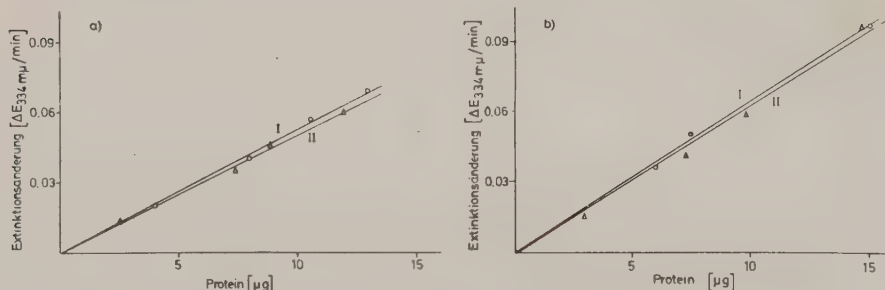


Abb. 17. Wirkung von SH-Giften auf die Aktivität der β -Ketoacyl-Reduktase.

Abb. 17 a. Wirkung von 10^{-2} M NÄM.

Kurve I (O—O): Enzym vor NÄM-Behandlung (314 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);

Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach NÄM-Behandlung (12 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

Abb. 17 b. Wirkung von 10^{-2} M JAA.

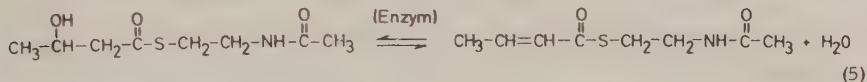
Kurve I (o—o): Enzym vor JAA-Behandlung (778 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);

Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach JAA-Behandlung (24 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

Einzelheiten s. Experimenteller Teil, S. 94, 96.

4. β -Hydroxyacyl-Dehydratase

Zur Bestimmung der Dehydratase-Komponente der Fettsäuresynthetase mißt man die Geschwindigkeit, mit welcher das Enzym die Wasserabspaltung aus dem Modellsubstrat β -Hydroxybutyryl-S- (N-acetylcysteamin) katalysiert (Lit. 6).



D (-)-Hydroxybutyryl-S-(N-acetylcysteamin)

Der Verlauf der Reaktion kann an Hand der Zunahme der Absorption bei $\lambda = 263 \text{ m}\mu$ [Dehydroacyl-thioester-Bande (Lit. 28)] verfolgt werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses von SH-Giften auf die Dehydratase war es erforderlich, das verwendete Synthetasepräparat nach der Behandlung mit NÄM oder JAA und dem anschließenden Zusatz von Cystein (s. S. 94) mit Hilfe einer Gelfiltration von den niedermolekularen Bestandteilen zu befreien. Auf diese Weise ließen sich störende, die Extinktion bei $\lambda = 263 \text{ m}\mu$ verändernde Nebenreaktionen vermeiden, welche bei Anwesenheit von Cystein und JAA im Reaktionsansatz zur Dehydratase-Bestimmung beobachtet wurden.

Abb. 18 beweist, daß die Dehydrataseaktivität der Fettsäuresynthetase durch JAA und NÄM nicht gehemmt wurde. Sulfhydrylgruppen, die von diesen SH-Giften angegriffen werden, sind also auch hier nicht an der Katalyse beteiligt.

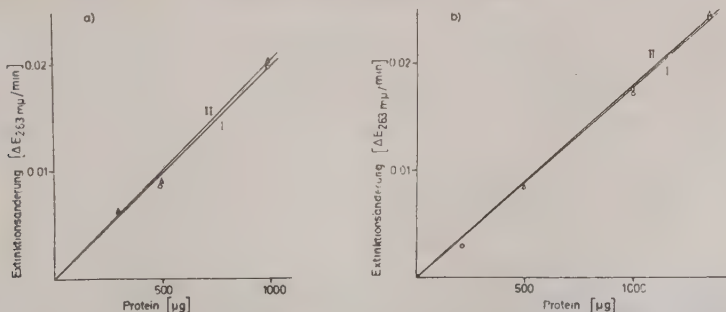


Abb. 18. Wirkung von SH-Giften auf die Aktivität der β -Hydroxyacyl-Dehydratase.

Abb. 18a. Wirkung von 10^{-2} M NÄM.

Kurve I (O—O): Enzym vor NÄM-Behandlung (236 mE/mg Fettsäuresynthetaseaktivität);

Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach NÄM-Behandlung (8 mE/mg Fettsäuresynthetaseaktivität).

Abb. 18b. Wirkung von 10^{-2} M JAA.

Kurve I (O—O): Enzym vor JAA-Behandlung (238 mE/mg Fettsäuresynthetaseaktivität);

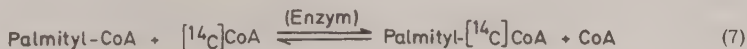
Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach JAA-Behandlung (5 mE/mg Fettsäuresynthetaseaktivität).

Einzelheiten vgl. Experimenteller Teil, S. 94, 97.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur 2. Reduktion wurde folgende Beobachtung gemacht: Setzte man dem Testgemisch (s. Exp. Teil, S. 98) eine geringe Menge Malonyl-CoA zu, wobei der Zusatz sowohl in die Meß- als auch in die Vergleichsküvette erfolgte, so wurde beim Start der Modellreaktion eine beträchtliche Steigerung des NADPH-Verbrauchs festgestellt. Die Anwesenheit von $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ Malonyl-CoA bewirkte eine Erhöhung des NADPH-Verbrauchs in der Zeiteinheit um den Faktor 40. Wie diese Erscheinung zu erklären ist, wurde nicht näher untersucht. Naheliegend ist der Gedanke, daß in Gegenwart von Malonyl-CoA Fettsäuresynthese stattfindet. Dies könnte dadurch zustandekommen, daß das Modellssubstrat im Multienzymkomplex ähnliche Veränderungen bewirkt, wie sie durch Einwirkung von JAA unter bestimmten Bedingungen hervorgerufen werden. Nach Untersuchungen von Oesterheld (Lit. 23) läßt sich der Enzymkomplex durch Beladung einer noch nicht identifizierten Akzeptorgruppe mit JAA derart modifizieren, daß er ohne Zusatz des "Starters" Acetyl-CoA aus Malonyl-CoA mit NADPH Fettsäuren synthetisiert. Es ist denkbar, daß das Modellssubstrat über seine Doppelbindung ebenfalls mit dieser Gruppe reagieren und - bei Anwesenheit von Malonyl-CoA und NADPH - Fettsäuresynthese veranlassen kann. Bei der 1. Reduktion konnte der oben beschriebene Effekt nicht beobachtet werden. Die Anwesenheit von 10^{-4}M Malonyl-CoA im Testansatz verursachte nur eine Steigerung des NADPH-Verbrauchs pro Minute um 33%.

6. Palmityl-Transferase

Die Palmityl-Transferase-Aktivität der Fettsäuresynthetase kann durch Messung der Geschwindigkeit bestimmt werden, mit der das Enzym die Übertragung des Palmitylrestes von Palmityl-CoA auf $[^{14}\text{C}]\text{CoA}$ katalysiert (Lit. 26).



Die Wirkung von NÄM und JAA auf die Transferase-Aktivität ist aus Abb. 20 ersichtlich. Das Ergebnis zeigt in beiden Fällen klar, daß weder NÄM noch JAA die Übertragungsreaktion inhibieren. Daraus folgt, daß am Transfer keine SH-Gruppen beteiligt sind.

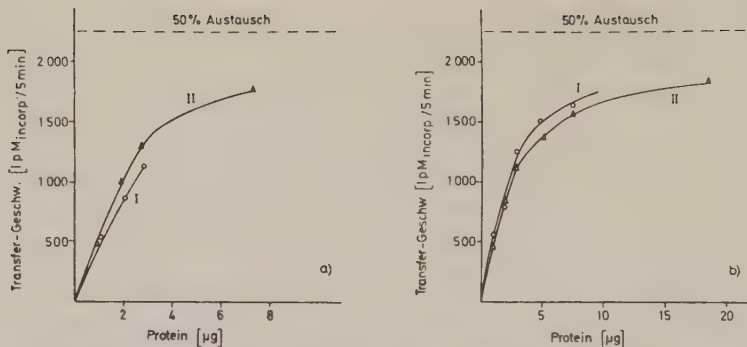


Abb. 20. Wirkung von SH-Giften auf die Aktivität der Palmityl-Transferase.

Abb. 20 a. Wirkung von 10^{-2} M NÄM.

Kurve I (o—o): Enzym vor NÄM-Behandlung (638 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);

Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach NÄM-Behandlung (21 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

Abb. 20 b. Wirkung von 10^{-2} M JAA.

Kurve I (o—o): Enzym vor JAA-Behandlung (667 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität);

Kurve II (Δ — Δ): Enzym nach JAA-Behandlung (18 mE/mg Fettsäuresyntheseaktivität).

Einzelheiten s. Exp. Teil, S. 94, 98.

7. Zusammenhang zwischen den Einzelaktivitäten und der Gesamtaktivität des Multienzymkomplexes

Im Verfolg der Hemmversuche an den Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase wurde ein Enzympräparat von unterschiedlicher Gesamtaktivität verwendet ¹⁾. Dies bot die Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen der fettsäure-synthetisierenden Gesamtaktivität des Komplexes und der Aktivität seiner Komponenten zu studieren. Ergänzt wurden diese Beobachtungen durch Untersuchungen am kristallisierten Enzym, die in Zusammenarbeit mit Oesterheld durchgeführt wurden, um die Identität der von Oesterheld aus Synthetase-Lösungen gezüchteten Kristalle mit Fettsäuresynthetase zu beweisen (Lit. 29).

¹⁾ Ein Teil des verwendeten Enzympräparats war bei der Anreicherung während des Ultrazentrifugationsschrittes eingefroren und hatte dadurch nahezu die Hälfte seiner Gesamtaktivität eingebüßt.

Tabelle 2. Zusammenhang zwischen den Einzelaktivitäten und der Gesamtaktivität verschiedener Fettsäuresynthetase-Präparate.

Enzym- komponente	Spezif. Aktivität [mE/mg]		Enzym- komponente	Spezif. Aktivität [mE/mg]	
	Enzym- komponente	Gesamt- komplex		Enzym- komponente	Gesamt- komplex
Acetyl- -Trans- ferase	62	1730	β -Hydroxy- acyl- -Dehydratase	7,85	1600
	68	1600		7,85	1400
	70 k	730 k		7,75 k	915 k
	82	643		5,47 k	250 k
	79	350		8,22	238
	63 k	8 k		6,74 k	80 k
Malonyl- -Trans- ferase	612	1600	α,β -Dehy- droacyl- -Reduktase	6,60	1670
	624	576		5,61	600
	605 k	60 k		6,47 k	240 k
				6,53 k	88 k
Konden- sierendes Enzym	2,4 ^a	1700 ^a	Palmityl- -Trans- ferase	510	1900
	0,1 ^a k	80 ^a k		560	683
				507 k	175 k
β -Keto- acyl- -Reduktase	760 ^a	1620 ^a			
	1036	778			
	850	314			
	500 ^a k	60 ^a k			

k = kristallisiertes Enzym; ^a Messung wurde von Oesterheld ausgeführt.

Die in Tab. 2 zusammengestellten Ergebnisse der Versuche zeigen, daß mit einer Abnahme der Gesamtaktivität des Multienzymkomplexes nicht notwendigerweise eine Abnahme der Aktivität aller seiner Komponenten verknüpft ist. Mit der Ausnahme des kondensierenden, die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese bestimmenden Teilenzyms (Lit. 23) blieben die Enzymkomponenten der untersuchten Synthetasepräparate beim Übergang zu niedrigeren Gesamtaktivitäten weitgehend aktiv.

8. Diskussion

Tab. 3 gibt die Auswertung der in den Abschnitten 1 bis 6 erhaltenen Meßdaten wieder. Aus einem Vergleich mit Angaben von Kirschner (Lit. 24), Hagen (Lit. 27) und Schweizer (Lit. 26) geht hervor (Tab. 4), daß in Übereinstimmung mit den Resultaten der beiden letztgenannten Autoren die Befunde Kirschners hinsichtlich der Hemmbarkeit von Malonyl- und Palmityl-Transferase nicht bestätigt werden konnten.

Tabelle 3. Wirkung von NÄM und JAA auf Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase (Auswertung der Meßdaten von Abb. 15 bis Abb. 20).

Enzym-komponente	Spezifische Aktivität [mE/mg]			
	vor NÄM-Behandlg.	nach NÄM-Behandlg.	vor JAA-Behandlg.	nach JAA-Behandlg.
Acetyl- -Transferase	79 (100%)	113 (143%)	82 (100%)	78 (95%)
Malonyl- -Transferase	572 (100%)	757 (132%)	576 (100%)	552 (96%)
β -Ketoacyl- -Reduktase	850 (100%)	833 (98%)	1036 (100%)	1000 (97%)
β -Hydroxyacyl- -Dehydratase	8,71 (100%)	8,90 (102%)	8,22 (100%)	8,22 (100%)
α,β -Dehydro- acyl-Reduktase	5,61 (100%)	5,57 (99%)	5,61 (100%)	5,56 (99%)
Palmityl- -Transferase	560 (100%)	661 (118%)	653 (100%)	653 (100%)

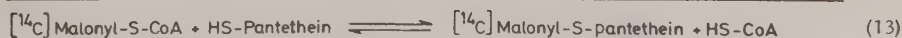
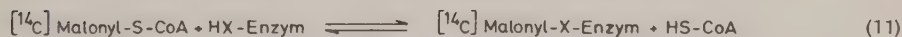
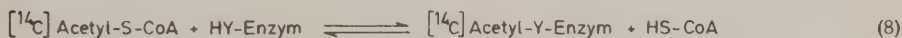
Tabelle 4. Angaben von Kirschner (Lit. 24), Hagen (Lit. 27) und Schweizer (Lit. 26) zur Wirkung von NÄM und JAA auf Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase.

Enzym-komponente	% Hemmung nach Einwirkung von				
	JAA ^a $1,67 \cdot 10^{-2}$ M	NÄM ^b $5 \cdot 10^{-3}$ M	JAA ^b $1 \cdot 10^{-2}$ M	NÄM ^c $2,5 \cdot 10^{-2}$ M	JAA ^c $2,5 \cdot 10^{-2}$ M
Acetyl- -Transferase	-	-	-	(25% Aktiv)	-
Malonyl- -Transferase	61	≈ 4	3	2	1
Kondensieren- des Enzym	95	-	-	-	-
β -Ketoacyl- -Reduktase	(18% Aktiv)	-	-	-	-
β -Hydroxyacyl- -Dehydratase	20	-	-	-	-
α,β -Dehydro- acyl-Reduktase	9	-	-	-	-
Palmityl- -Transferase	67	-	-	2	22

^a Angaben von Kirschner; ^b Angaben von Hagen; ^c Angaben von Schweizer.

Keines der von uns untersuchten Teilenzyme der Synthetase konnte durch NÄM oder JAA inhibiert werden. Bei allen Transferasen wurde nach Einwirkung von NÄM sogar eine Aktivitätssteigerung um 18-43% beobachtet. Die Hemmversuche lieferten somit keinen Anhaltspunkt, daß außer den bereits bekannten "zentralen" und "peripheren" SH-Gruppen noch weitere Sulfhydrylgruppen an der Katalyse der Fettsäuresynthese beteiligt sind.

Der Befund, daß Acetyl- und Malonyl-Transferase durch Schwefelgifte nicht gehemmt werden, steht in Einklang mit den Vorstellungen über die chemische Natur ihrer Wirkstellen "-YH" und "-XH" (vgl. S. 4) und einer als wahrscheinlich anzusehenden Beteiligung dieser Gruppen an der Katalyse der Modellreaktionen im Sinne der Gleichungen (8) und (9) bzw. (11) und (12) (vgl. dazu auch S. 26).



Nach einem analogen Mechanismus verläuft vermutlich auch die Modellreaktion für den Palmityl-Transfer [Gl. (14) und Gl. (15)]. Dafür sprechen Befunde von Lust (Lit. 30) und Ayling (Lit. 31), die in der Fettsäuresynthetase als "ZH"-Gruppen bezeichnete Akzeptorgruppen nachweisen konnten, welche Palmitylreste kovalent, jedoch nicht thioesterartig binden.



Die nur nach Einwirkung von NÄM, nicht jedoch nach Einwirkung von JAA beobachtete Erhöhung der Aktivität der Transferasen hängt wahrscheinlich mit der Tatsache zusammen, daß NÄM, im Gegensatz zu JAA, die Akzeptorgruppe des zentralen Transportarms des Enzymkomplexes blockiert (Lit. 23). Es ist vorstellbar, daß den Modellsubstraten die aktiven Zentren der Transferasen in gesteigertem Maße zugänglich sind, wenn der Transportarm mit NÄM beladen ist und sich dadurch nicht mehr in den aktiven Zentren der Transferasen aufhalten kann.

III. Charakterisierung der Acetyl-Transferase in der Fettsäuresynthetase

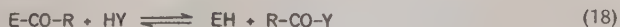
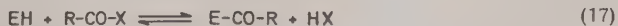
Die Acetyl-Transferase übt im Multienzymkomplex die Funktion aus, den "Starter" der Fettsäuresynthese, den Acetylrest, von Coenzym A auf das reaktive Schwefelatom des 4'-Phosphopantetheins der "acyl carrier protein"-Komponente zu übertragen (vgl. Abb. 3 S. 5).

In Kapitel B II, 1. wurde aufgeführt, wie sich die Aktivität der Enzymkomponente bestimmen läßt.

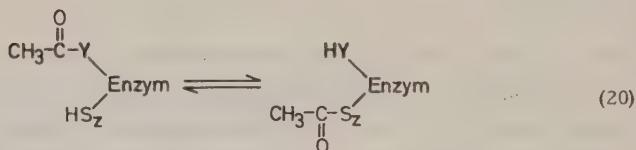
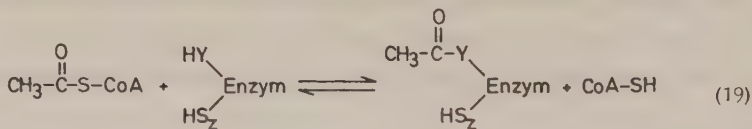
Die Untersuchung, über die im folgenden berichtet wird, hatte das Ziel, das aktive Zentrum des Enzyms zu charakterisieren. Dabei konzentrierte sich das Interesse auf die Identifizierung der im aktiven Bereich lokalisierten essigsäure-übertragenden Wirkgruppe "-YH". Die Kenntnis dieser Gruppe bildet die Grundlage für das Verständnis des Mechanismus der Übertragungsreaktion.

Die in der Einleitung geschilderten Befunde von Schweizer und Oesterheld (vgl. S. 4) und die Resultate der Hemmversuche des Kapitels B II, 1. der vorliegenden Arbeit legten nahe, daß es sich bei der Wirkgruppe "-YH" nicht um eine SH-Gruppe handelte.

Zur Aufklärung ihrer chemischen Natur bedienten wir uns der Methode, die Gruppe durch Einwirkung von radioaktivem Substrat mit $[^{14}\text{C}]$ Essigsäureresten zu markieren und die nach proteolytischem Abbau des acetylierten Enzyms erhaltenen markierten Spaltpeptide zu analysieren. Die notwendigen Voraussetzungen für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens sind die Bildung einer Acyl-Enzym-Zwischenverbindung im Verlauf der vom Enzym katalysierten Übertragungsreaktion und die Fixierbarkeit der Bindung des Acyl-Restes an das Enzym. Bei zahlreichen acylübertragenden Enzymen sind derartige Bedingungen erfüllt. In einem Zweistufenprozeß spaltet eine Wirkstelle im aktiven Zentrum der Enzyme das Acyl-Substrat und übernimmt den Acylrest in kovalenter Bindung. Aus dieser Zwischenverbindung heraus, die in vielen Fällen isoliert werden kann, erfolgt die Bildung des Produktes ("double displacement"-Mechanismus) (Lit. 32-34):



Auch die Essigsäure-Übertragungsreaktion in der Fettsäuresynthetase verläuft wahrscheinlich nach einem ähnlichen Mechanismus [Gl. (19) und Gl. (20)].



Hierfür spricht die zuerst von Schweizer (Lit. 18, 22) beobachtete Bildung einer kovalenten (nicht-thioesterartigen) Acetyl-Enzym-Verbindung nach Einwirkung von Acetyl-CoA auf das Enzym (vgl. S. 4).

1. Markierung der Akzeptorgruppe

Bei der Einwirkung von [^{14}C]Acetyl-CoA auf Fettsäuresynthetase werden drei verschiedene Akzeptorgruppen mit [^{14}C]Acetylresten beladen: die Wirkgruppe "-YH" der Acetyl-Transferase, die SH-Gruppe des 4'-Phosphopantetheins der ACP-Komponente und die SH-Gruppe des Cysteins im kondensierenden Teilenzym (Lit. 18, 23). Um die Bildung der unerwünschten [^{14}C]Acetyl-Thioester zu verhindern, blockierten wir die reaktiven Sulfhydrylgruppen des Enzymkomplexes mit Ellman's Reagenz [Bis-(3-carboxy-4-nitrophenyl)-disulfid] (Lit. 35, 23, 36). Der Zusatz des SH-Giftes brachte zugleich den Vorteil, daß das bei der Acetyl-Beladungsreaktion freiwerdende Coenzym A abgefangen wurde (Abb. 21). Auf diese Weise wurde das Gleichgewicht der Beladungsreaktion auf die Seite des [^{14}C]Acetyl-Enzyms gezogen und somit dessen Ausbeute erhöht. Nach dem Ausfällen des Enzyms mit Trichloressigsäure beobachteten wir eine durchschnittliche spezifische Beladung von 2.9 Mol Acetylresten/Mol Fettsäuresynthetase (Tab. 5).

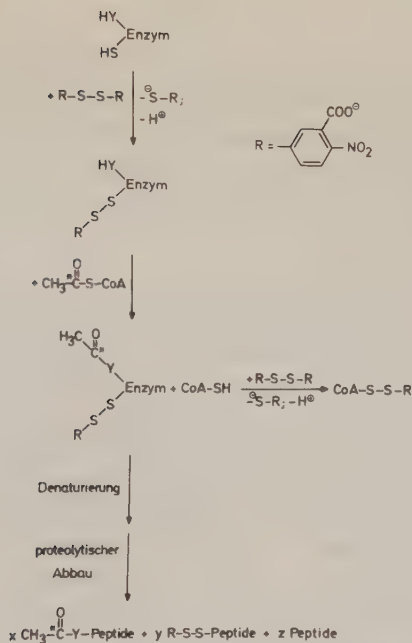


Abb. 21. Schema der Beladung der Akzeptorgruppe "YH" mit $[^{14}\text{C}]$ Acetylresten.

Tabelle 5. Beladung von Fettsäuresynthetase mit $[^{14}\text{C}]$ Acetylresten in Gegenwart von Ellman's Reagenz.

Enzympräparat Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Fettsäuresynthetase-aktivität vor Beladung [mE/mg]	1510	1160	2040	990	1400	1420	1730
Spezif. Beladung [Mol Acetylreste/Mol Enzym]	3,2 ^a	2,8 ^b	2,4 ^b	2,7 ^{a,c}	2,9 ^{a,c}	2,8 ^{a,c}	3,3 ^{a,c}

^a Messung der Radioaktivität nach Auflösen des TCE-gefällten $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms in Ameisensäure;

^b Messung der Radioaktivität nach peptischer Verdauung des TCE-gefällten $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms (vgl. S. 31);

^c Messung der Radioaktivität nach tryptischer Verdauung des TCE-gefällten $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms (vgl. S. 47).

Weitere Einzelheiten s. Exp. Teil, S. 98.

Eine Fällung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms in neutralem Milieu hatte keine Änderung der spezifischen Beladung zur Folge. Dies bewies ein Versuch, bei dem wir einen Teil des beladenen Enzyms mit Trichloressigsäure, einen anderen Teil jedoch durch Zugabe einer konzentrierten Harnstofflösung bis zur Endkonzentration 8 M denaturierten. Es zeigte sich, daß beide Präparate dieselbe spezifische Beladung aufwiesen (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 99).

Um noch sicherzustellen, daß in Gegenwart von Ellman's Reagenz dieselben nicht-thiolartigen Akzeptorgruppen mit Essigsäureresten beladen wurden wie bei Abwesenheit des Hemmstoffes, behandelten wir in Parallelansätzen unter identischen Bedingungen ungehemmte Fettsäuresynthetase und das nach dem oben geschilderten Verfahren gehemmte Enzym mit [^{14}C]Acetyl-CoA. Die erhaltenen [^{14}C]Acetyl-Enzyme wurden mit Pepsin verdaut und die Peptidgemische mit chromatographischen Methoden verglichen (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 99 , 100 ff.). Bereits nach zwei aufeinanderfolgenden, unter genau gleichen Bedingungen ausgeführten Chromatographien an DEAE- bzw. CM-Sephadex wurde ersichtlich (Abb. 22-25), daß der Hemmstoff das Auftreten der an Hand ihrer Labilität gegenüber Perameisensäure (Lit. 37) identifizierten [^{14}C]Acetylthioester-Peptide (alle nicht näher bezeichneten Gipfel der Abb. 22 sowie die Gipfel $\text{P}_{\text{I-II}}$ von Abb. 24) weitgehend verhinderte (vgl. dazu S. 57). Das Peptidmuster der peroxydationsstabilen [^{14}C]Acetyl-Peptide wurde dagegen nur unwesentlich verändert. Wie die Abb. 24 und 25 zu erkennen geben, wurde in beiden Fällen das Gemisch der radioaktiven Nicht-Thioester-Peptide am Kationenaustauscher in drei Peptidgemische von abgestufter Basizität aufgespalten: P_{III} , P_{IV} , P_{V} bzw. P_{1-3} , P_{4-8} , P_{9-15} ^{*)}. Diese Beobachtungen deckten sich mit Resultaten, die Oesterhelt (Lit. 23) bei Untersuchungen an [^{14}C]Acetyl-Fettsäuresynthetase erhalten hatte, die teils mit, teils ohne Vorbehandlung durch JAA mit Essigsäure beladen worden war.

Zur weiteren Sicherstellung der Identität der Peptidgemische P_{III} , P_{IV} und P_{V} mit den Peptidgemischen P_{1-3} , P_{4-8} und P_{9-15} studierten wir ihr Verhalten in der Papierelektrophorese und in der Papierchromatographie. Wie Tab. 6 zeigt, stimmten die elektrophoretischen Mobilitäten und die R_f -Werte einander entsprechender Peptide überein.

Auf Grund der geschilderten Befunde war anzunehmen, daß Ellman's Reagenz bei der Beladung der Fettsäuresynthetase mit Acetylresten keine unerwünschten Nebenreaktionen verursachte.

^{*)} Zur Bezeichnung der Peptide vgl. Kap. B, III, 2.

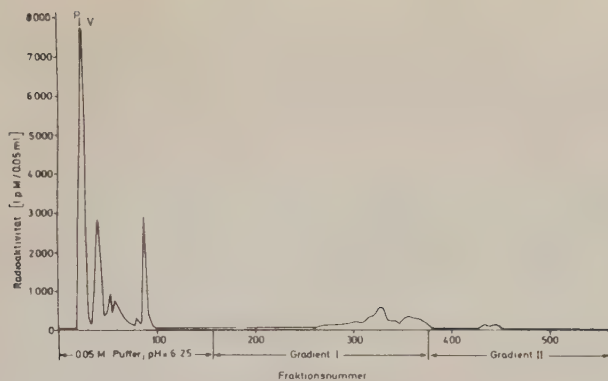


Abb. 22. DEAE-Sephadex-Chromatographie des peptischen Hydrolysats von $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Fettsäuresynthetase.

Säule: 200×1 cm; Probevolumen: 2 ml; Start: 0,05 M Pyridin-Formiat, pH 6,25; Gradient I: + 0,5 M Pyridin-Formiat, pH 4,5; Gradient II: + 2 M Pyridin-Formiat, pH 4,5; Mischvolumen: konst. 400 ml; Fraktionsvolumen: 2 ml.

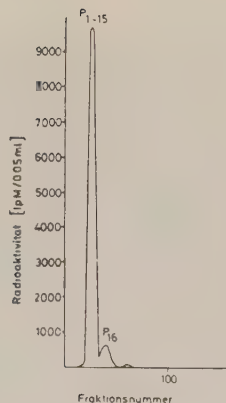


Abb. 23. DEAE-Sephadex-Chromatographie des peptischen Hydrolysats von $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase (mit Ellman's Reagenz behandelt).

Säule, Probe- und Fraktionsvolumen wie bei Abb. 22, Eluant: 0,05 M Pyridin-Formiat, pH 6,25.

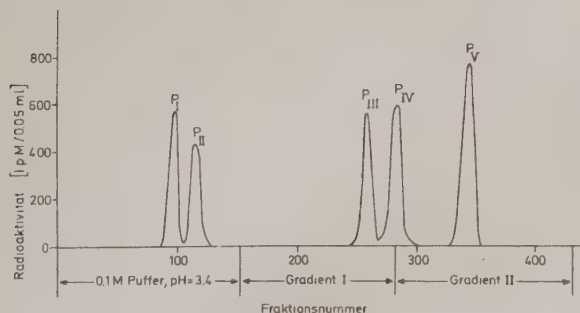


Abb. 24. CM-Sephadex-Chromatographie des Peptidgemisches P_{I-V} von Abb. 22.

Säule: 200×1 cm; Probevolumen: 2 ml; Start: 0,1 M Pyridin-Formiat, pH 3,4; Gradient I: + 1 M Pyridin-Formiat, pH 3,7; Gradient II: + 2 M Pyridin-Formiat, pH 4,5; Mischvolumen: konst. 200 ml; Fraktionsvolumen: 3,4 ml.

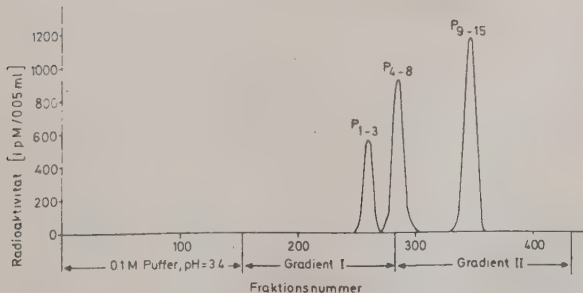


Abb. 25. CM-Sephadex-Chromatographie des Peptidgemisches P_{1-15} von Abb. 23.

Einzelheiten wie bei Abb. 24

[†]) Die Durchführung einer Gradientenelution wie im Versuch von Abb. 22 erübrigte sich, da mit den in der Abb. wiedergegebenen $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptiden bereits die gesamte Radioaktivität von der Säule eluiert worden war.

Tabelle 6. Papierelektrophoretischer und papierchromatographischer Vergleich der Peptidgemische P_{III}, P_{IV} und P_V mit den Peptidgemischen P₁₋₃, P₄₋₈ und P₉₋₁₅.

[¹⁴ C]Acetyl-Peptidgemisch	Papierelektrophorese ^a		Papierchromatographie
	pH 6,2	pH 1,9	Lsgm. C ^b
	m [cm ² /V · sec]	m [cm ² /V · sec]	R _f
P _{III}	7,9 · 10 ⁻⁵ Ka		0,00
P ₁₋₃	7,9 · 10 ⁻⁵ Ka		0,00
P _{IV}	6,4 · 10 ⁻⁵ Ka		0,04
P ₄₋₈	6,4 · 10 ⁻⁵ Ka		0,04
P _V		8,1 · 10 ⁻⁵ Ka	0,00
P ₉₋₁₅		8,1 · 10 ⁻⁵ Ka	0,00

^a Die bei diesen Versuchen verwendete Elektrophoreseapparatur gewährleistete nicht die Konstanthaltung des pH-Wertes während des Laufes. Die hier aufgeführten Absolutwerte für die elektrophoretischen Mobilitäten der Peptide weichen daher z.T. erheblich von Werten ab, die in späteren Versuchen unter Benutzung der auf S. 102 beschriebenen Elektrophoreseeinrichtung erhalten wurden (vgl. Tab. 7-9, S. 36-38).

^b Zusammensetzung des Lösungsmittelsystems s. Tab. 28, S. 104.

Verwendete Abkürzungen vgl. S. IV. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 102 ff.

2. Spaltung des [¹⁴C]Acetyl-Enzyms mit Pepsin und Trennung der Spaltprodukte

Von den bekannten proteolytischen Enzymen spalten nur Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin die Eiweißstoffe an einer so begrenzten Anzahl von Peptidbindungen, daß sie zum kontrollierten Abbau der Proteine verwendet werden können (Lit. 38, 39). Trypsin besitzt unter den genannten Enzymen die größte, Pepsin die geringste Spezifität. Während Trypsin Peptidbindungen nur an der Carboxylgruppe der Aminosäuren Lysin und Arginin angreift und damit meist nur eine relativ kleine Zahl von Bruchstücken freisetzt, spaltet Pepsin die Peptidketten von Proteinen an wesentlich mehr Stellen, wobei i. allg. ein verwickelt zusammengesetztes Gemisch von zahlreichen Peptiden entsteht (Lit. 38, 39). Das Enzym der Wahl für den Primärabbau von Proteinen ist daher Trypsin.

Es liefert die geringste Zahl an Spaltstücken, je kleiner jedoch deren Anzahl ist, desto einfacher ist ihre Trennung. Die Anwendungsmöglichkeit von Trypsin wird dadurch eingeschränkt, daß es seine optimale Wirkung im alkalischen Milieu entfaltet (pH-Optimum: 7-9) (Lit. 38). Es schien deshalb längere Zeit für die Spaltung von Proteinen, die wie die Acetyl- und Malonyl-Synthetase alkalilabile Reste enthalten (Lit. 22, 23), nicht brauchbar zu sein (vgl. dazu jedoch Kap. B, III, 5.). Im Gegensatz zu Trypsin (und Chymotrypsin) entwickelt Pepsin seine maximale Aktivität im sauren pH-Bereich (pH-Optimum: 1-2) (Lit. 40). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde Pepsin als das geeignete Hilfsmittel zur Spaltung der mit Essigsäure und Malonsäure beladenen Fettsäuresynthetase angesehen (Lit. 18, 22, 23).

Erste Versuche zur peptischen Spaltung von acetyl-beladener Synthetase und zur Reinigung der Spaltprodukte wurden von Schweizer (Lit. 22) vorgenommen. Später untersuchte Oesterheld (Lit. 23) eingehend die nach Einwirkung von Pepsin auf das [^{14}C] Acetyl-Enzym gebildeten radioaktiven Acetyl-Peptide. Diese Arbeiten führten zur Isolierung eines [^{14}C]Acetylthioester-Peptids der "zentralen" SH-Gruppe. Die Reinigung der peroxydationsstabilen [^{14}C]Acetyl-Y-Peptide (vgl. Abb. 21, S. 27) gelang bisher nicht. Die Untersuchungen Oesterhelds zeigten, daß Pepsin das Acetyl-Enzym in ein außerordentlich komplexes Gemisch von Peptiden zerlegte. Die Zahl der Spaltpeptide dürfte sich auf ca. 1000 bis 2000 belaufen (vgl. Lit. 23). Die Isolierung der radioaktiven Acetyl-Peptide aus diesem Gemisch wurde durch ihre Alkalilabilität erschwert. Um die Abspaltung des [^{14}C]Acetylrestes zu vermeiden, mußten alle Reinigungsoperationen auf den sauren pH-Bereich beschränkt werden (Lit. 23).

Trotz der zu erwartenden Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung der Reaktionsprodukte hielten wir zu Beginn unserer Untersuchungen am Acetyl-Enzym an der von Schweizer eingeführten Spaltung von Acyl-Synthetase durch Pepsin fest. Neben der Verbesserung des Darstellungsverfahrens für das Ausgangsmaterial (vgl. S. 26) sollte der Einsatz von bisher noch nicht benutzten Trennmethoden weiterhelfen, die [^{14}C]Acetyl-Y-Peptide in reiner Form zu isolieren.

a) Spaltung

Das Verfahren, welches wir zur peptischen Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Y-Enzyms anwendeten, folgte der Vorschrift von Schweizer (Lit. 18, 22) und Oesterheld (Lit. 23).

Das mit Trichloressigsäure denaturierte Enzym wurde in verdünnter Salzsäure suspendiert und 39 Stunden bei Raumtemperatur mit 10% seines Gewichts an Pepsin behandelt

(experimentelle Einzelheiten vgl. S. 99). Die Lösung der Spaltprodukte wurde nach der Entfernung des Pepsins dem im folgenden beschriebenen Trennungsgang unterworfen.

b) Trennungsgang für die Spaltprodukte

Der im nachstehenden geschilderte Trennungsgang baut auf den Resultaten einer großen Zahl von Vorversuchen auf, mit denen wir die vorteilhaftesten Wege zur Trennung der Peptide erkundeten. Die Methoden zur DEAE- und CM-Sephadex-Chromatographie übernahmen wir von Schweizer (Lit. 22) und Oesterheld (Lit. 23). Der Trennungsgang beschreibt die Aufarbeitung des peptischen Hydrolysats von 1,6 g [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase⁺).

Die Vortrennung der Peptide erfolgte durch säulenchromatographische Verfahren, die für die Fraktionierung der vorhandenen großen Substanzmengen geeignet waren.

Anionenaustauscherchromatographie. Als erstes wurde das Peptidgemisch auf einer DEAE-Sephadex-Säule fraktioniert⁺⁺). Abb. 26 zeigt, daß zwei radioaktive Gipfel (P_{1-15} und P_{16}) erhalten wurden, die 78 % (P_{1-15}) bzw. 7 % (P_{16}) der zur Chromatographie eingesetzten Radioaktivität enthielten.

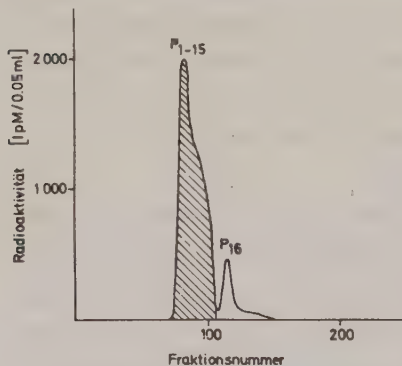


Abb. 26. Chromatographie des peptischen Hydrolysats von [^{14}C] Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase an DEAE-Sephadex.

Säule: 4,3 · 200 cm; Probevolumen: 30 ml;
Eluant: 0,05 M Pyridin-Formiat, pH 6,25;
Fraktionsvolumen: 15 ml.

Bei diesem Trennungsschritt wurden ferner sämtliche Carboxynitrophenyl-Reste enthaltende Peptide (vgl. Abb. 21, S. 27) vom Ionenaustauscher festgehalten, was sich am Auftreten einer intensiv gelb gefärbten Zone im oberen Teil der Säule zu erkennen gab.

⁺) Eigenschaften des eingesetzten [^{14}C]Acetyl-Enzyms s. S.27, Tab. 5, Präparat Nr. 3.

⁺⁺) Es wurde jeweils nur die Hälfte des Peptidgemisches in einem Gang fraktioniert, um eine Überladung der Säule zu vermeiden.

Kationenaustauscherchromatographie. Die vereinigten Fraktionen des Gipfels P_{1-15} (schraffierte Fläche) von Abb. 26 wurden an CM-Sephadex chromatographiert. Die Säule entwickelten wir mit einer Pufferlösung allmählich ansteigender Ionenstärke und ansteigendem pH-Wert (Gradientenelution). Aus dem in Abb. 27 wiedergegebenen Elutionsdiagramm ist zu ersehen, daß das Peptidgemisch in drei radioaktive Gemische aufgespalten wurde, die 21% (P_{1-3}), 25% (P_{4-8}) und 27% (P_{9-14}) der zur Chromatographie gekommenen Radioaktivität auf sich vereinigten (vgl. dazu auch Abb. 25, S. 29).

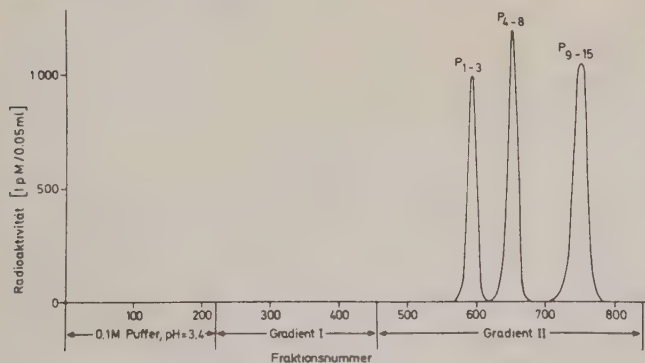


Abb. 27. Chromatographie des Peptidgemisches P_{1-15} an CM-Sephadex.

Säule: 4,3'182 cm; Probevolumen: 10 ml; Start: 0,1 M Pyridin-Formiat, pH 3,4; Gradient I: + 1 M Pyridin-Formiat, pH 3,7; Gradient II: + 2 M Pyridin-Formiat, pH 4,5; Mischvolumen: konst. 2:1; Fraktionsvolumen: 15 ml.

Gelfiltration. Zu ihrer weiteren Reinigung wurden die Peptidgemische des Versuchs von Abb. 27 über Sephadex-G 15-Säulen filtriert. In den Eluatzen wurden neben der Radioaktivität der Gehalt an ninhydrin-positivem Material bestimmt (Lit. 41, 42, 23). Wie sich aus den Elutionsdiagrammen (Abb. 28-30) entnehmen läßt, wurden von den radioaktiven Peptiden zahlreiche nichtradioaktive Peptide abgetrennt. Die in den schraffierten Gebieten liegenden Fraktionen wurden jeweils vereinigt. Die Ausbeuten an [^{14}C]Acetyl-Peptid betrugen bei P_{1-3} 91%, bei P_{4-8} 76% und bei $P_{9,11-15}$ 77% der eingesetzten Radioaktivität. Bei der Filtration von P_{9-15} wurde die Abtrennung eines kleinen Gipfels (P_{10}) beobachtet, der 8% der auf die Säule aufgesetzten Radioaktivität enthielt.

Mit den im vorstehenden geschilderten säulenchromatographischen Verfahren war es uns gelungen, die Hauptmenge der [^{14}C]Acetyl-Peptide in drei Gruppen von abgestufter Basizität aufzuspalten und darüber hinaus einen großen Teil der vorhandenen nicht-radioaktiven Peptide abzutrennen. Wir konnten nun dazu übergehen, nach anderen Trennprinzipien arbeitende, jedoch nur geringe Kapazität aufweisende Verfahren anzuwenden.

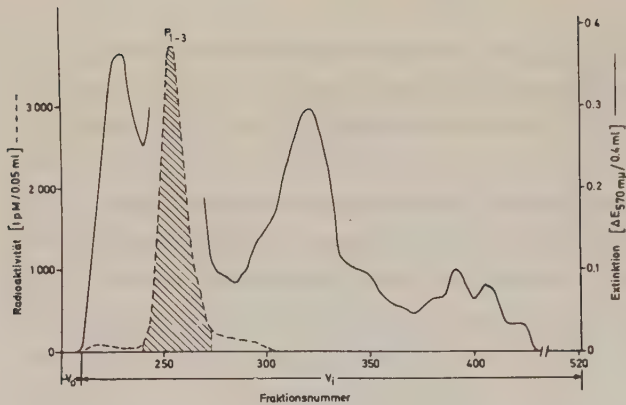


Abb. 28. Gelfiltration des Peptidgemisches P_{1-3} an Sephadex G 15.

Säule: 3,6·202 cm; Probevolumen: 2 ml; Eluant: 0,05 M Pyridin-Formiat, pH 6,25; Durchfluß: 28-32 ml/h; Fraktionsvolumen: 3,3 - 3,5 ml.

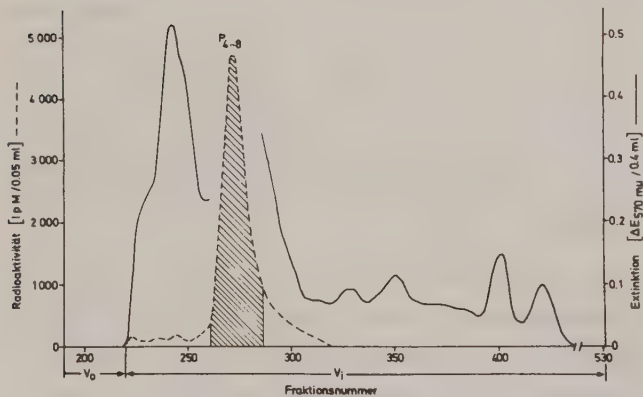


Abb. 29. Gelfiltration des Peptidgemisches P_{4-8} an Sephadex G 15.

Säule, Probevolumen, Eluant wie bei Abb. 28; Durchfluß: 30-33 ml/h; Fraktionsvolumen: 3,3 ml.

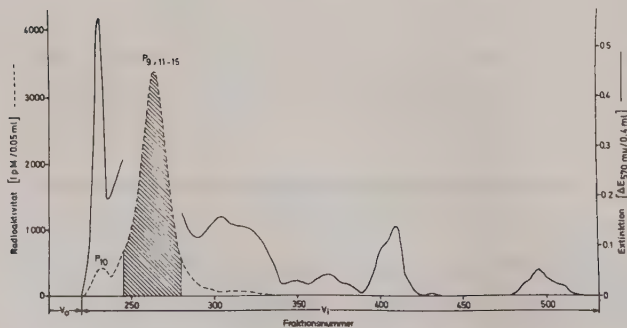


Abb. 30. Gelfiltration des Peptidgemisches P_{9-15} an Sephadex G 15.

Säule, Probevolumen, Eluant, Fraktionsvolumen wie bei Abb. 29; Durchfluß: 28-31 ml/h.

Papierelektrophorese. Als besonders geeignet zur Lösung der vorliegenden komplizierten Trennprobleme erwies sich die Elektrophorese der Peptide auf Papier als Trägermaterial. Wir beobachteten, daß sich zahlreiche Peptide aus den Gemischen abtrennen ließen, wenn letztere wiederholt der Elektrophorese bei unterschiedlichen pH-Werten unterworfen wurden. Die Trennoperationen wurden in einer nach der Methode von Michl (Lit. 43) arbeitenden Hochvoltelektrophoreseanlage durchgeführt (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 102).

Papierchromatographie. Neben der Papierelektrophorese benutzten wir die Papierchromatographie zur Trennung der Peptide (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 103). Eine Übersicht über die von uns bei den einzelnen papierchromatographischen Reinigungsschritten verwendeten Laufmittel gibt Tab. 28, S. 104.

Die Position der radioaktiven Peptide auf den Elektropherogrammen und Papierchromatogrammen ermittelten wir durch Radioautographie. Abgetrennte nicht-radioaktive Peptide wurden auf dem Papier mit Hilfe der Ninhydrinreaktion ausfindig gemacht (vgl. Exp. Teil S. 102).

Die Einzelheiten der mit den genannten Verfahren durchgeführten Trennungsgänge für die Peptidgemische P_{1-3} , P_{4-8} und $P_{9;11-15}$ sind in den Tab. 7-9 (S. 36-38) zusammengestellt.

Nach Abschluß aller Trennoperationen hatten wir das peptische Hydrolysat des [^{14}C]Acetyl-Enzyms in insgesamt 16 verschiedene radioaktive Acetyl-Peptide aufgespalten, von denen 3 die Hauptmenge der Radioaktivität auf sich vereinigten: $P_1 = 21\%$, $P_4 = 16\%$ und $P_9 = 14\%$. Von diesen Peptiden waren am Ende des Trennungsganges noch vorhanden: $P_1 = 41 \text{ nMol}$, $P_4 = 25 \text{ nMol}$ und $P_9 = 14 \text{ nMol}$.

Eine Übersicht über den gesamten Trennungsgang für die peptischen [^{14}C]Acetyl-Peptide gibt Abb. 31, S. 39.

Tabelle 7. Trennungsgang für das Peptidgemisch P₁₋₃.

Trenn- methode	[¹⁴ C]Acetyl-Peptide			nicht-radioaktive Peptide		
	Peptid ^a	m ^b [cm ² /V · sec]	R _f ^c	m ^b [cm ² /V · sec]	R _f ^c	Farbe ^d
1. PE, pH 6,4	P _{1,3} (67%)	10,3 · 10 ⁻⁵ Ka		1,9 · 10 ⁻⁵ Ka		violett
				2,4 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				5,6 · 10 ⁻⁵ Ka		"
	P ₂ (6%)	9,7 · 10 ⁻⁵ Ka		6,9 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				8,1 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				9,6 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				13,5 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				14,4 · 10 ⁻⁵ Ka		"
2. PC, Lsgm. C	P _{1,3} (86%)		0,00		0,08 0,14	violett "
3. PC, Lsgm. E	P ₁ (72%)		0,04		0,02 0,06	violett "
					0,07	"
	P ₃ (7%)		0,34		0,29	gelb
4. PE, pH 1,9	P ₁ (56%)	15,9 · 10 ⁻⁵ Ka		15,0 · 10 ⁻⁵ Ka		violett
5. PC, Lsgm. B	P ₁ (73%)		0,02		0,03	gelb
					0,07	violett
					0,14	"
					0,20	gelb
					0,28 0,54	" violett

^a Die in Klammern stehenden Prozentzahlen geben die Anteile der Radioaktivität an, die nach der Trennoperation von der jeweils eingesetzten Radioaktivitätsmenge auf die einzelnen Peptide entfielen.

^b Die Mobilitäten der Peptide schwankten unter dem Einfluß verschiedener Faktoren (vgl. Lit. 44) um max. ± 15%. Stets konstant blieb jedoch das Verhältnis der Mobilitäten benachbarter Peptide in derselben Mischung.

^c Die Schwankungen der R_f-Werte betrugen bis zu 10%.

^d Farbe nach Behandlung mit Ninhydrin.

Verwendete Abkürzungen vgl. S. IV. Einzelheiten zur Durchführung der Trennoperationen vgl. Text und Exp. Teil, S. 102 ff.

Tabelle 8. Trennungsgang für das Peptidgemisch P₄₋₈.

Trenn- methode	¹⁴ C]Acetyl-Peptide			nicht-radioaktive Peptide		
	Peptid	m [cm ² /V · sec]	R _f	m [cm ² /V · sec]	R _f	Farbe
1. PE, pH 6,4	P ₄₋₈ (71%)	8,6 · 10 ⁻⁵ Ka		1,7 · 10 ⁻⁵ Ka 2,1 · 10 ⁻⁵ Ka 5,7 · 10 ⁻⁵ Ka 6,4 · 10 ⁻⁵ Ka 6,7 · 10 ⁻⁵ Ka 7,3 · 10 ⁻⁵ Ka 7,7 · 10 ⁻⁵ Ka 9,4 · 10 ⁻⁵ Ka 10,6 · 10 ⁻⁵ Ka 10,8 · 10 ⁻⁵ Ka 11,7 · 10 ⁻⁵ Ka 12,1 · 10 ⁻⁵ Ka 12,6 · 10 ⁻⁵ Ka		violett " " " " " " " " " " " " "
2. PC, Lsgm. C	P _{4;6-8} (89%) P ₅ (3%)		0,04 0,15		-	
3. PE, pH 1,9	P _{4;6-8} (68%)	14,0 · 10 ⁻⁵ Ka		9,2 · 10 ⁻⁵ Ka 11,2 · 10 ⁻⁵ Ka 12,3 · 10 ⁻⁵ Ka 14,1 · 10 ⁻⁵ Ka 15,3 · 10 ⁻⁵ Ka 17,6 · 10 ⁻⁵ Ka 18,9 · 10 ⁻⁵ Ka 20,0 · 10 ⁻⁵ Ka		violett " " " " " " " "
4. PC, Lsgm. E	P _{4;8} (62%) P ₆ (14%) P ₇ (3%)		0,09 0,11 0,36		0,06 0,08 0,13 0,16	" " " "
5. PC, Lsgm. A	P _{4;8} (84%)		0,03		0,37 0,40	violett "
6. PC, Lsgm. B	P _{4;8} (79%)		0,04		0,16	violett
7. PC, Lsgm. F	P ₄ (58%) P ₈ (22%)		0,34 0,25		0,27	gelb

Erläuterungen s. Legende Tab. 7, S. 36.

Tabelle 9. Trennungsgang für das Peptidgemisch P_{9;11-15}.

Trenn- methode	[¹⁴ C]Acetyl-Peptide			nicht-radioaktive Peptide		
	Peptid	m [cm ² /V · sec]	R _f	m [cm ² /V · sec]	R _f	Farbe
1. PE, pH 1,9	P _{9;12-15} (60 %)	16,0 · 10 ⁻⁵ Ka		14,2 · 10 ⁻⁵ Ka 15,3 · 10 ⁻⁵ Ka 16,9 · 10 ⁻⁵ Ka 17,8 · 10 ⁻⁵ Ka 19,3 · 10 ⁻⁵ Ka		violett " " " "
	P ₁₁ (7 %)	12,8 · 10 ⁻⁵ Ka				
2. PE, pH 6,4	P _{9;13-15} (73 %)	7,8 · 10 ⁻⁵ Ka		1,7 · 10 ⁻⁵ Ka 2,2 · 10 ⁻⁵ Ka 5,2 · 10 ⁻⁵ Ka 6,3 · 10 ⁻⁵ Ka 7,2 · 10 ⁻⁵ Ka 9,4 · 10 ⁻⁵ Ka 12,2 · 10 ⁻⁵ Ka		violett " " " " " "
	P ₁₂ (3 %)	6,9 · 10 ⁻⁵ Ka				
3. PC, Lsgm. B	P _{9;13-15} (95 %)		0,01		0,17 0,24 0,31 0,38	violett " gelb violett
4. PC, Lsgm. A	P _{9;13-15} (90 %)		0,02		0,43	violett
5. PE, pH 3,5	P _{9;14-15} (65 %)	10,6 · 10 ⁻⁵ Ka		2,6 · 10 ⁻⁵ Ka		violett
	P ₁₃ (3 %)	7,5 · 10 ⁻⁵ Ka				
6. PC, Lsgm. E	P _{9;15} (65 %)		0,09		0,04	violett
	P ₁₄ (22 %)		0,17			
7. PC, Lsgm. F	P ₉ (35 %)		0,27		0,12	violett
	P ₁₅ (10 %)		0,38			

Erläuterungen s. Legende Tab. 7, S. 36.

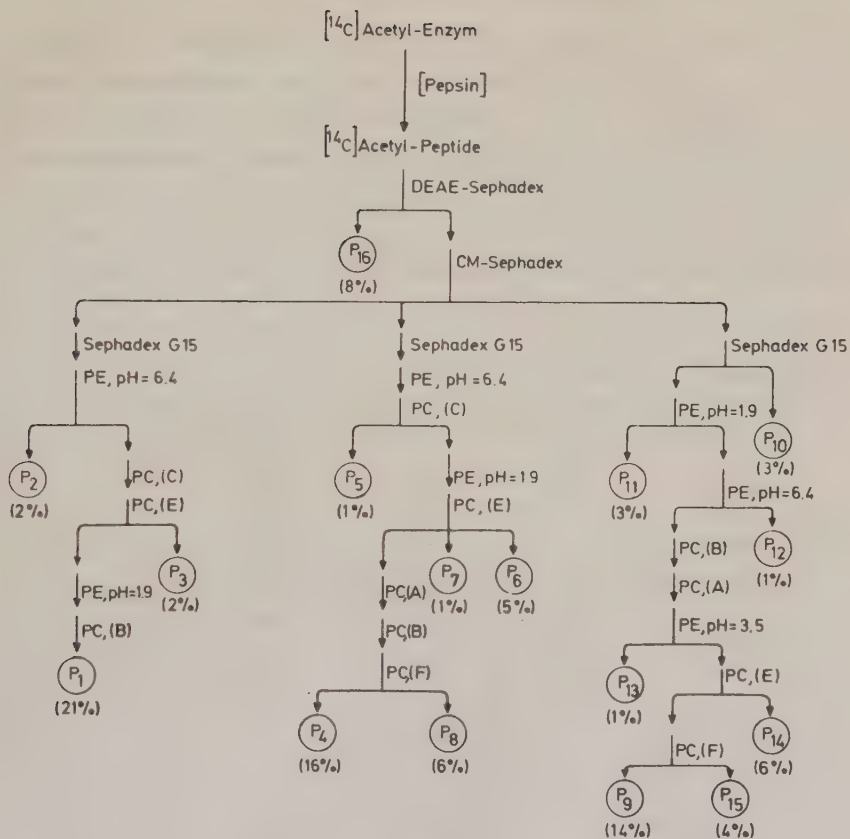


Abb. 31. Trennungsgang für die peptischen $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide.

Verwendete Abkürzungen vgl. S. IV. Die in Klammern angegebenen Prozentzahlen sind Näherungswerte für den Anteil des betreffenden Peptids an der Gesamtmenge der $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide. $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide, deren Anteil an der Gesamtmenge der radioaktiven Peptide unter 1% lag wurden nicht in das Schema aufgenommen.

3. Aminosäurezusammensetzung der peptischen [^{14}C]Acetyl-Peptide

Zur Bestimmung ihrer Aminosäurezusammensetzung wurden Aliquote der [^{14}C]Acetyl-Peptide P_1 , P_4 und P_9 mit Salzsäure hydrolysiert und im Aminosäureanalysator untersucht. Die Analysenergebnisse zeigen (Tab. 10), daß Peptid P_1 in reiner Form vorlag, während Peptid P_4 geringe und Peptid P_9 noch größere Mengen an Fremdpeptiden enthielten.

Tabelle 10. Aminosäureanalyse der [^{14}C]Acetyl-Peptide P_1 , P_4 und P_9 .

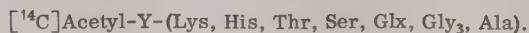
Aminosäure	P_1	P_4	P_9
	Aminosäurereste/Molekül [^{14}C]Acetyl-Peptid		
Lys	1,16 (1)	1,27 (1)	1,98 (2)
His	1,08 (1)	1,19 (1)	1,20 (1)
Arg	-	-	0,69
Asp	-	0,26	0,34
Thr	1,05 ^a (1)	1,35 ^a (1)	1,70 ^a
Ser	1,18 ^a (1)	1,42 ^a (1)	3,43 ^a
Glu	1,15 (1)	1,34 (1)	1,84
Pro	-	-	-
Gly	3,03 (3)	4,33 (4)	5,80
Ala	1,08 (1)	1,32 (1)	1,50
Cys	-	-	-
Val	-	-	-
Met	-	-	-
Ile	-	-	-
Leu	-	1,12 (1)	1,83
Tyr	-	-	0,32
Phe	-	-	-
Trp ^b	-	-	-
β -Ala	-	-	-

^a Werte wurden nicht korrigiert.

^b Tryptophanbestimmung mit Ehrlich's Reagenz (Lit. 45).

Die angenommene Anzahl der Aminosäurereste ist in Klammern gesetzt. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 104.

Die Werte der Tabelle kennzeichnen P_1 als ein [^{14}C]Acetyl-Nonapeptid der Zusammensetzung



Sie lassen ferner vermuten, daß P_4 wie folgt zusammengesetzt ist:



Über P_9 können wegen der vorhandenen Verunreinigungen noch keine genauen Angaben gemacht werden.

Wie auf Grund ihres Verhaltens in der Chromatographie an Ionenaustauschern und in der Elektrophorese zu erwarten war, enthielten alle drei Peptide basische Aminosäuren. Als Bindungsstellen der $[^{14}\text{C}]\text{Acetylreste}$ kamen die Hydroxylgruppen der Serin- und Threoninreste in Frage.

Mit Hilfe der Dansylchlorid-Methode (Lit. 46, 47) wurde die N-terminale Aminosäure des in reiner Form vorliegenden Peptids P_1 als Alanin identifiziert. Weitere Untersuchungen zur Struktur der Peptide waren zunächst wegen Substanzmangels nicht möglich (vgl. Kap. B, III, 7. b,c).

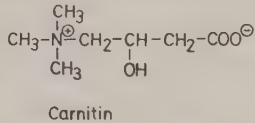
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Auftrennung des durch Pepsin-Einwirkung auf das $[^{14}\text{C}]\text{Acetyl-Enzym}$ erhaltenen komplexen Peptidgemisches schwierig und äußerst zeitraubend ist. Die große Zahl der erforderlichen Trennoperationen bringt es ferner mit sich, daß die Ausbeuten, in denen sich die $[^{14}\text{C}]\text{Acetyl-Peptide}$ isolieren lassen, nur sehr gering sind. Die Hauptmenge der Peptide geht durch Adsorption an den bei den Reinigungsverfahren benutzten Trägermaterialien verloren.

Eine Wiederholung der peptischen Spaltung unter Einsatz einer größeren Menge Ausgangsmaterial hielten wir für nicht zweckmäßig, angesichts der langwierigen und verlustreichen Aufarbeitungsprozedur. Aussichtsreicher erschien es uns, durch Anwendung einer spezifischeren Spaltmethode auf das $[^{14}\text{C}]\text{Acetyl-Enzym}$ die Zahl der Bruchstücke zu reduzieren. Dadurch sollte es möglich sein, den Trennungsgang abzukürzen und Peptide aus dem aktiven Zentrum der Transferase in besseren Ausbeuten zu fassen.

Ehe wir dieses Vorhaben in Angriff nahmen, führten wir eine Untersuchung durch, von der wir uns auf einem anderen Wege einen Hinweis auf die chemische Natur der Acetyl-Akzeptorgruppe der Transferase erhofften. Die Anregung zu dieser Untersuchung gab uns Herr Dr. B. Hamprecht, Institut für Biochemie der Universität München.

4. Carnitin als möglicher Acetyl-Akzeptor der Transferase

Nach den bisherigen Befunden kamen als Träger der radioaktiven Essigsäurereste in den peptischen [^{14}C]Acetyl-Peptiden die Aminosäuren Serin und Threonin in Betracht. Darüber hinaus mußte jedoch auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß der Essigsäurerest an einem Bestandteil der Peptide fixiert war, der bislang seiner Identifizierung entgangen war, weil er nicht zur Gruppe der durch die Ninhydrinreaktion nachweisbaren Aminosäuren gehörte und damit nicht mit der bisher benutzten Analysemethode entdeckt werden konnte. Eine solche Substanz, die einerseits nicht zum Verbindungstyp der ninhydrin-positiven Aminosäuren zählt, von der andererseits bekannt ist, daß sie als ein hervorragender Acetyl-Akzeptor fungieren kann, ist Carnitin (γ -Trimethylammonium- β -hydroxybutyrat) (Lit. 48).



Carnitin dient im Fettsäurestoffwechsel als "carrier" für aktivierte Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran (Lit. 48-51). Die Mitochondrienmembran ist für die CoA-Derivate der Fettsäuren weitgehend undurchlässig. Die Carnitinester der Fettsäuren, die in der Zelle aus Carnitin und den Acyl-CoA-Verbindungen gebildet werden, können diese Barriere hingegen passieren (Abb. 32).

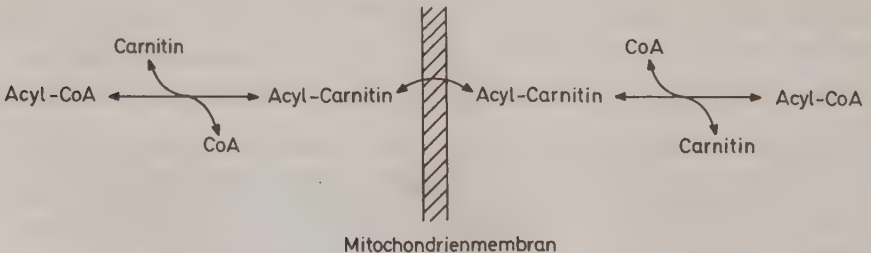


Abb. 32. Schematische Darstellung der Funktion von Carnitin als Acylgruppen-"carrier" durch die Mitochondrienmembran.

Carnitin kommt im Gewebe in erster Linie in freier Form vor (Lit. 50); seine feste Verankerung in einem Enzymprotein wurde bisher nicht beobachtet. Hamprecht (Lit. 52) äußerte die Vermutung, daß Carnitin als Bestandteil der von uns untersuchten Acetyl-Transferase im Sinne von Abb. 33 die Funktion des Acetyl-Überträgers ausüben könnte. Die Anwesenheit eines positiv geladenen, amidartig gebundenen Carnitinrestes in den peptischen [^{14}C]Acetyl-Peptiden schien mit der beobachteten großen Affinität dieser Peptide zu Kationenaustauschern vereinbar zu sein.

Um diese Vermutung zu prüfen, untersuchten wir, ob Fettsäuresynthetase Carnitin enthält.

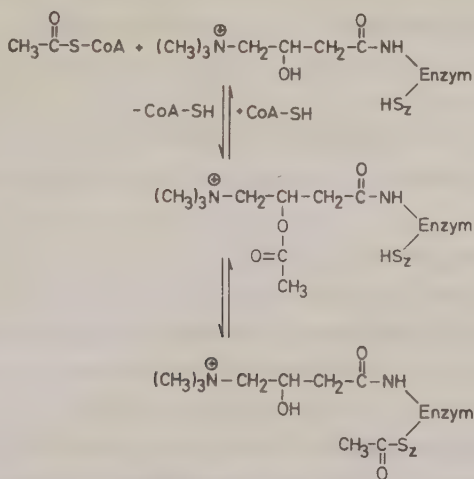


Abb. 33. Hypothetischer Verlauf der Acetyl-Übertragungsreaktion unter Mitwirkung eines enzymgebundenen Carnitins.

a) Stabilität des Carnitins

Die erste Aufgabe bestand darin, Versuchsbedingungen zu ermitteln, unter denen es möglich sein sollte, Carnitin unter Erhaltung seiner Struktur aus einem Peptidverband herauszulösen.

Peptidbindungen lassen sich durch Einwirkung von Salzsäure bei erhöhter Temperatur spalten. Die Totalhydrolyse aller Bindungen zwischen den Aminosäureresten eines Peptids wird i.allg. nach 20-24stündigem Erhitzen des Peptids auf 105-110°C in Gegen-

wart von 6 N HCl beobachtet (Lit. 39, 53) (vgl. dazu auch S. 104). Wir untersuchten die Stabilität des Carnitins unter diesen Bedingungen. Die Versuchsergebnisse zeigten, daß nach 22stündigem Erhitzen auf 110°C in 6 N HCl noch durchschnittlich 60% des eingesetzten Carnitins (Ausgangskonzentration 10^{-3} M) vorhanden waren. Der Rest war vermutlich unter Wasserabspaltung in Crotonsäurebetain umgewandelt worden (Lit. 54). Zur Bestimmung des Carnitins verwendeten wir das enzymatische Verfahren von Fritz (Lit. 55).

Mit diesem Resultat rückte ein Nachweis von Carnitin im Totalhydrolysat der Fettsäuresynthetase in den Bereich des Möglichen. Die Voraussetzung für eine zuverlässige Bestimmung des Carnitins im Spaltgemisch war, daß die in großem Überschuß vorhandenen Aminosäuren abgetrennt wurden. Wir entwickelten daher eine Methode, die es erlaubte, sehr geringe Mengen von Carnitin aus einem Proteinhydrolysat zu isolieren.

b) Isolierung von Carnitin aus einem Proteinhydrolysat

Ein Verfahren, das zur Gewinnung sehr kleiner Carnitinmengen aus einem Proteinhydrolysat geeignet war, mußte drei Forderungen erfüllen. Es sollte 1. wegen der großen chemischen Ähnlichkeit zwischen den zu trennenden Substanzen eine hohe Trennleistung aufweisen, 2. nur zu geringen Substanzverlusten führen und 3. exakt reproduzierbar sein, um die sichere Erfassung des Carnitins im Hydrolysat zu gewährleisten. In der Ionenaustauscherchromatographie fanden wir eine Methode, die diesen Anforderungen gerecht wurde.

Um Carnitin bei der Ausarbeitung des Trennverfahrens rasch und zuverlässig neben den Aminosäuren nachweisen zu können, bedienten wir uns der Isotopenmarkierung. Wir synthetisierten [^{14}C]Carnitin und studierten das Verhalten dieser Substanz auf der 60 cm-Säule des Aminosäureanalysators im Verein mit Aminosäuregemischen. Dabei zeigte sich, daß sich unter den Bedingungen der Aminosäureanalyse nach (Lit. 56, 57) alle Aminosäuren mit Ausnahme des Phenylalanins von Carnitin abtrennen ließen.

Die Entfernung des Phenylalanins und gleichzeitig die Lösung des Problems, geringe Mengen von Carnitin bei niedrigen Verlusten von einem großen Überschuß an Aminosäuren reproduzierbar abzutrennen, erreichten wir durch den Einsatz eines automatischen Ionenaustauscherchromatographen von großer Kapazität.

In Abb. 34 a, S. 46, ist das Resultat eines Versuches wiedergegeben, bei dem wir eine Mischung aus [^{14}C]Carnitin und einem Serumalbuminhydrolysat auf einer großvolumigen

Säule mit sphärischem Kationenaustauscherharz (Beckman M 75) chromatographierten. Den Verlauf der Elution verfolgten wir durch Messung der Radioaktivität der Fraktionen und durch qualitative Feststellung ihres Aminosäuregehalts mit dem Ninhydrin-Tüpfeltest (Lit. 23). Auf eine zeitraubende quantitative Bestimmung der Aminosäuren wurde verzichtet, da sie für die Beurteilung des Erfolgs der Chromatographie unwesentlich war. Der Abb. kann entnommen werden, daß bei geeigneter Entwicklung der Säule (s. Legende der Abb.) die völlige Abtrennung des Carnitins von den Aminosäuren zu erreichen war. Unter den von uns gewählten Bedingungen wurde Carnitin nach den sauren und neutralen Aminosäuren und vor den basischen eluiert. Dies folgte aus einem weiteren Versuch, bei dem wir eine Testmischung aus [^{14}C]Carnitin und drei charakteristischen Aminosäuren (Asp, Phe, Lys) chromatographierten. Die Verluste an Carnitin hielten sich bei diesem Trennprozeß in erträglichen Grenzen ($25 \pm 4\%$). Wichtig für die nachfolgenden Versuche war, daß die Position des Carnitins im Eluat über einen relativ großen Bereich nur geringfügig von der Zusammensetzung und den Mengenverhältnissen der Aminosäuren in der Testmischung beeinflußt wurde.

c) Abwesenheit vom L-Carnitin in der Fettsäuresynthetase

Nachdem wir die Methode zur Isolierung von kleinen Carnitinmengen aus Aminosäuregemischen beherrschten, konnten wir daran gehen, das Vorkommen von Carnitin im Totalhydrolysat der Fettsäuresynthetase zu prüfen. Zu diesem Zweck hydrolysierten wir eine größere Menge des Enzyms (516 mg) mit Salzsäure (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 109) und unterwarfen das Gemisch der Spaltprodukte anschließend in 4 Teilen der Ionenaustauscherchromatographie (Abb. 34 c, S. 46). Im Kontrollversuch wurde Serumalbumin (258 mg) mit D,L-Carnitin (336 Mol) versetzt und unter identischen Bedingungen hydrolysiert und chromatographiert (Abb. 34 b, S. 46). Die in den Abbildungen eingezeichneten Fraktionen wurden vereinigt, gefriergetrocknet und in konzentrierter Form gelöst. Die Bestimmung ihres L-Carnitingehalts nach (Lit. 55) unter Benutzung von Carnitin-Acetyltransferase scheiterte zunächst daran, daß in den Lösungen eine Substanz enthalten war, die das Enzym inaktivierte. Wie die nähere Untersuchung zeigte, wurde die Störung durch Calciumacetat verursacht, welches bei der Ionenaustauscherchromatographie eingeschleppt worden war ⁺⁾ . Zur Abtrennung des

⁺⁾ Das zur Verfügung stehende, von der Herstellerfirma neu entwickelte Ionenaustauscherharz enthielt im Inneren der Harzpartikel größere Mengen an Ca^{2+} -Ionen, die während der Chromatographie an die Oberfläche der Teilchen wanderten. Der Ca^{2+} -Gehalt ließ sich auch durch mehrtägiges Kochen des Harzes mit Säuren nicht in ausreichendem Maße senken.

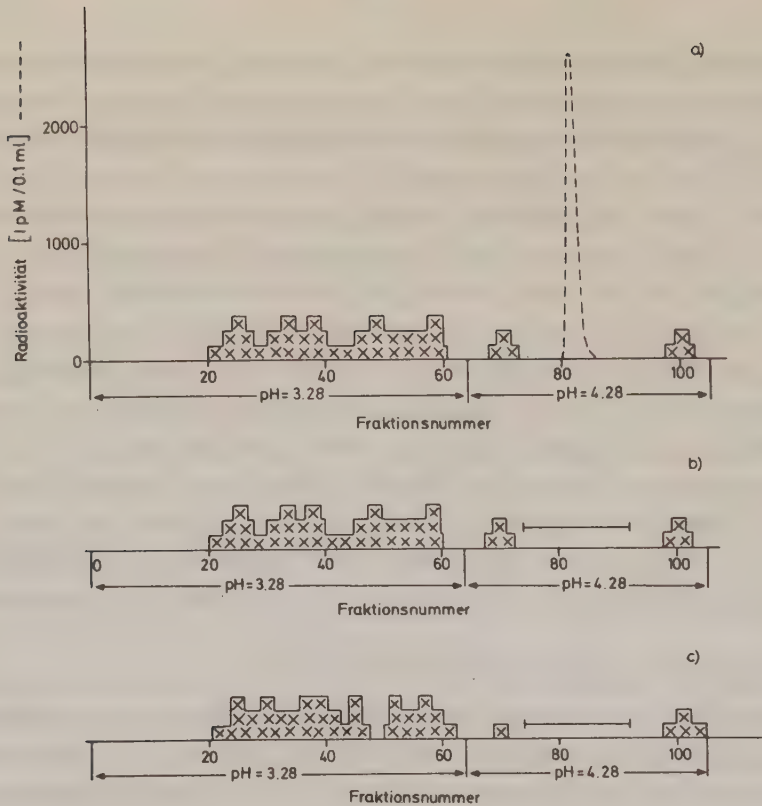


Abb. 34. Kationenaustauscherchromatographie zur Isolierung von Carnitin aus Proteinhydrolysaten.

Gerät: Ünichrom Präparativzusatz; Säule: 1,9·160 cm; Harz: Beckman M 75/203; Arbeitstemperatur: 50,5°C; Eluant: 0,5 M Pyridin-Acetat, pH 3,28 bzw. 4,28; Arbeitsdruck: 20–24 kp/cm²; Durchfluß: 160–214 ml/h; Fraktionsvolumen: 250 Tropfen (= 8,9–11,9 ml)/Fraktion; Regeneration der Säule: 1 M Pyridin-Acetat, pH 6,5.

- a) Probe: 170 nMol D,L-[¹⁴C] Carnitin (4,2·10⁶ IpM/µMol) + Hydrolysat von 129 mg Serumalbumin, gelöst in 2 ml 0,5 M Pyridin-HCl, pH 2,2.
 b) Probe: Hydrolysat einer Mischung von 168 nMol D,L-Carnitin + 129 mg Serumalbumin, gelöst in 2 ml 0,5 M Pyridin-HCl, pH 2,2.
 c) Probe: Hydrolysat von 129 mg Fettsäuresynthetase, gelöst in 2 ml 0,5 M Pyridin-HCl, pH 2,2.

⊗⊗⊗: Ninhydrin-positive Fraktionen;

—: Fraktionen, deren Carnitingehalt bestimmt wurde.

Weitere Erläuterungen s. Text und Exp. Teil, S. 101.

Salzes führten wir eine Papierchromatographie durch (Lsgm. C; R_f -Wert des Carnitins: 0,35). Hierbei ermittelten wir die Lage möglicher Carnitinbanden an Hand von Markierungen, die wir mit $[^{14}\text{C}]$ Carnitin auf der Startlinie anbrachten. Die Eluate aus den Papierchromatogrammen wurden auf ihren Carnitingehalt untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 35 wiedergegeben. Während der enzymatische Test (Lit. 55) für den Kontrollversuch (Kurve I) das Vorliegen von L-Carnitin (26% der eingesetzten Menge) anzeigte, konnte im Hydrolysat der Fettsäuresynthetase (Kurve II) kein L-Carnitin nachgewiesen werden. Wir zogen aus diesem Resultat den Schluß, daß die Synthetase wahrscheinlich kein L-Carnitin enthält.

Dieser Befund wurde durch Versuche von Bruckdorfer (Lit. 58) gestützt, der nach Zusatz von $[^{14}\text{C}]$ Carnitin zu einer Hefekultur und Isolierung von Fettsäuresynthetase aus dieser Hefe keinen Einbau von Radioaktivität in das Enzym beobachtete.

Weitere Untersuchungen zum Vorkommen von Carnitin in der Fettsäuresynthetase wurden durch die Resultate, über die in den folgenden Kapiteln berichtet wird, gegenstandslos.

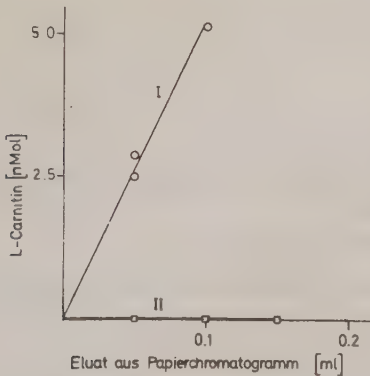


Abb. 35. Abwesenheit von L-Carnitin im Totalhydrolysat der Fettsäuresynthetase.

Kurve I (o—o): Kontrollversuch (Serumalbumin + D,L-Carnitin);
Kurve II (□—□): Fettsäuresynthetase.
Nähere Einzelheiten s. Text.

5. Spaltung des $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms mit Trypsin und Trennung der Spaltprodukte

a) Spaltung des $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms und Vortrennung der Peptidgemische

Die Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung der peptischen Spaltprodukte des $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms (S. 41) veranlaßten uns, seine Hydrolysierbarkeit durch Trypsin zu untersuchen (vgl. dazu S. 30). Hierbei war es erforderlich, die Spaltversuche wegen der Alkalilabilität der $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzym-Bindung außerhalb des pH-Optimums des Trypsins im neutralen bis schwach sauren Milieu durchzuführen. Die geringe Aktivität des Trypsins in diesem pH-Gebiet wurde durch Einsatz einer größeren Enzymmenge ausgeglichen (Lit. 59).

Wir wählten für unser Vorhaben den pH-Bereich von 6,9-7,0 und erkundeten zunächst in Vorversuchen, ob bei diesem pH-Wert und mit einem Verhältnis von 1 mg Trypsin/10 mg Substrat eine Spaltung der [^{14}C]Acetyl-Synthetase ohne Verlust von Radioaktivität zu erzielen war. In Abb. 36 ist das Resultat eines Versuches wiedergegeben, bei dem wir das [^{14}C]Acetyl-Enzym im Autotitrator mit Trypsin inkubierten und den Verlauf der Hydrolyse am Natronlaugeverbrauch verfolgten (Kurve I).

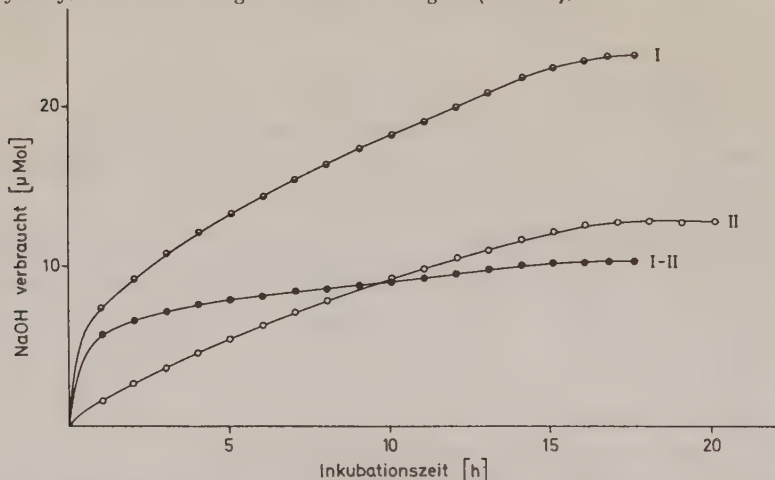


Abb. 36. Zeitlicher Verlauf des Natronlaugeverbrauchs bei der tryptischen Verdauung von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase.

Kurve I (●—●): Trypsin (3,6 mg) + [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase (36 mg);

Kurve II (○—○): Trypsin (3,6 mg).

Kurve I-II (●—●) beschreibt den zeitlichen Verlauf des durch die Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms verursachten Verbrauchs an Natronlauge.

Einzelheiten vgl. Exp. Teil, S. 100.

Im Parallelversuch studierten wir die Autolyse des Trypsins in Abwesenheit des Substrats, jedoch unter sonst gleichen Bedingungen (Kurve II). Aus einer Subtraktion beider Kurven ging hervor (Kurve I-II), daß der mit der Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms verknüpfte Natronlaugeverbrauch nach 14-15 Stunden abgeschlossen war. Wir folgerten daraus, daß es nicht sinnvoll ist, die Inkubation über diese Zeit hinaus auszudehnen. Wie die Untersuchung des Hydrolysats ergab, waren zu diesem Zeitpunkt 53% der Gesamtradioaktivität des denaturierten [^{14}C]Acetyl-Enzyms in lösliche [^{14}C]Acetyl-Peptide umgewandelt worden. Der Rest lag noch in ungelöster Form vor. Radioaktive Essigsäure war nicht freigesetzt worden. Aus diesen Beobachtungen konnte man schließen, daß Trypsin sich unter den benutzten Versuchsbedingungen zur Gewinnung

von radioaktiven Spaltstücken des [^{14}C]Acetyl-Enzyms heranziehen ließ. Wir führten daher die Verdauung im präparativen Maßstab durch und entwickelten ein Verfahren zur Trennung der Spaltprodukte.

Als Ausgangsmaterial für die im folgenden mitgeteilten Spalt- und Trennoperationen dienten 2,6 g [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase^{*)}. Das mit Trichloressigsäure denaturierte Enzym wurde in einer ersten Spaltprozedur 15 Stunden mit 10% seines Gewichts an Trypsin bei pH 6,9-7,0 und 37°C inkubiert (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 100). Hierauf wurde das Ungelöste abzentrifugiert und für eine Nachbehandlung mit Trypsin bei 0°C aufbewahrt. Der lösliche Teil der Spaltprodukte, der 48% der Radioaktivität des [^{14}C]Acetyl-Enzyms enthielt, wurde eingeengt und zur Entfernung des Trypsins und zur Beurteilung der Größe der entstandenen Spaltstücke über eine Sephadex-G 25-Säule filtriert. Wie aus dem in Abb. 37 wiedergegebenen Elutionsdiagramm zu ersehen ist, gelang es nicht, die vorhandenen radioaktiven Peptide restlos voneinander zu trennen.

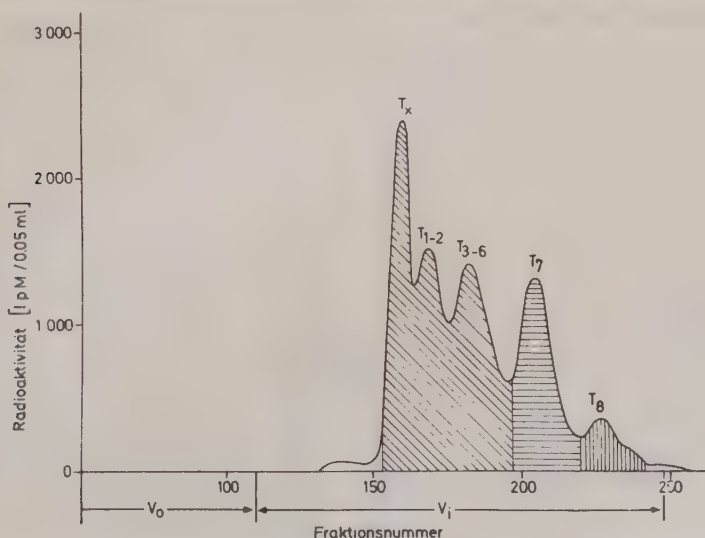


Abb. 37. Sephadex-G25-Filtration der löslichen Peptide des tryptischen Hydrolysats von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase.

Säule: 4,2-199 cm; Probevolumen: 40 ml; Eluant: 5proz. Essigsäure; Durchfluß: 35 ml/h; Fraktionsvolumen: 10 ml.

^{*)} Eigenschaften des eingesetzten [^{14}C]Acetyl-Enzyms s. S. 27, Tab. 5, Präparat Nr. 6.

Immerhin sind deutlich fünf verschiedene Gipfel zu erkennen, deren Fraktionen in der angegebenen Weise (schraffierte Flächen) vereinigt wurden. Von der zur Chromatographie eingesetzten Radioaktivität entfielen auf die Gipfel T_X , T_{1-2} und T_{3-6} (schräg schraffierte Fläche) 67%, auf den Gipfel T_7 (waagrecht schraffierte Fläche) 21% und auf den Gipfel T_8 (senkrecht schraffierte Fläche) 5%.

Die Vermutung lag nahe, daß es sich bei den drei zuerst eluierten Peptidgemischen um Produkte unvollständiger tryptischer Spaltung handelte. Sie wurden daher nach Lyophilisation und erneutem Auflösen in Wasser nochmals 15 Stunden mit 10% Trypsin bei pH 6,9-7,0 und 37°C behandelt. Das Hydrolysat wurde wieder über Sephadex G 25 filtriert. Das Elutionsdiagramm (Abb. 38) zeigt, daß von den ursprünglich vorhandenen drei Gipfeln nur noch zwei große übrig geblieben waren, die 19% (T_{1-2} , schräg karierte Fläche) bzw. 59% (T_{3-6} , schräg schraffierte Fläche) der zur Gelfiltration eingesetzten Radioaktivität auf sich vereinigten. Daneben waren noch zwei kleine Gipfel entstanden (T_7 und T_8), die je 2% der Radioaktivität enthielten.

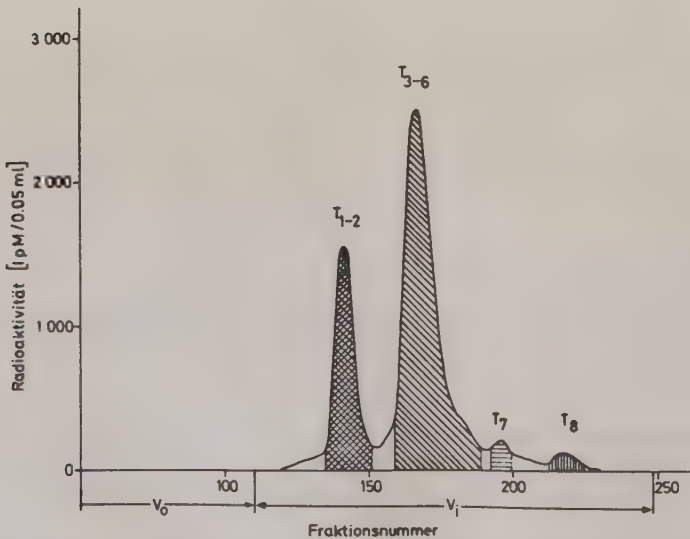


Abb. 38. Sephadex-G25-Filtration des tryptischen Hydrolysats des Peptidgemisches T_X - T_{1-2} - T_{3-6} von Abb. 37.

Säule, Eluant und Fraktionsvolumen wie bei Abb. 37; Probevolumen: 15 ml; Durchfluß: 40 ml/h.

Ebenfalls einer Nachbehandlung mit Trypsin wurde der beim ersten Verdauungsversuch ungelöst gebliebene Teil des [^{14}C]Acetyl-Enzyms unterworfen. Hierzu wurde das Enzym aufs neue in Wasser suspendiert und 15 Stunden mit 10% Trypsin bei pH 6,9-7,0 und 37°C inkubiert. Nach Entfernung des unverdaulichen Rückstandes, der noch 19% der in diesen Versuch eingesetzten Radioaktivität enthielt, wurde der Spaltansatz wie schon in den vorhergehenden Experimenten über Sephadex G 25 filtriert. Die im Eluat beobachteten beiden Gipfel (Abb. 39) enthielten 10% (T_{1-2} , schräg karierte Fläche) bzw. 75% (T_{3-6} , schräg schraffierte Fläche) der zur Chromatographie gekommenen Radioaktivität. Beide Peptidgemische erwiesen sich auf Grund ihres Elutionsverhaltens sowie ihrer elektrophoretischen Eigenschaften bei pH 6.4 und pH 3.5 als identisch mit den entsprechenden Peptidgemischen des Versuchs von Abb. 38. Sie wurden daher mit diesen vereinigt.

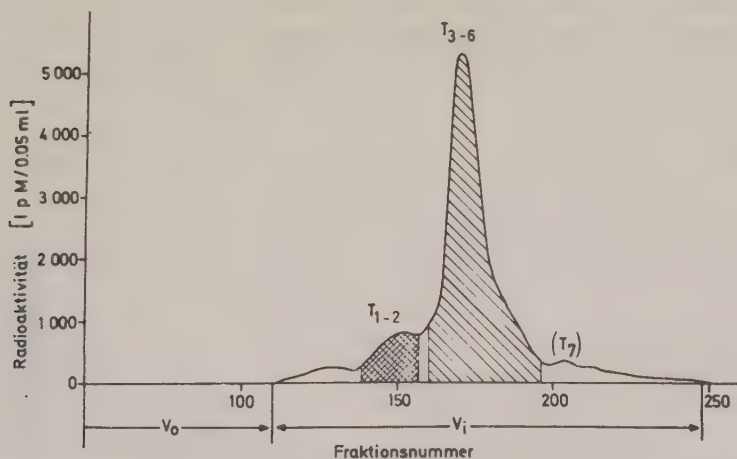


Abb. 39. Sephadex-G25-Filtration des Hydrolysats der tryptischen Nachverdauung von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase.

Säule, Probevolumen, Eluant, Fraktionsvolumen wie bei Abb. 38; Durchfluß: 42 ml/h.

Nach Beendigung der oben geschilderten Spaltoperationen lag folgendes Resultat vor: Von der Gesamtmenge des eingesetzten [^{14}C]Acetyl-Enzyms waren nach dreimaliger Anwendung von Trypsin 90% in lösliche [^{14}C]Acetyl-Peptide umgewandelt worden. Diese Peptide ließen sich mit Trypsin nicht mehr in kleinere Bruchstücke zerlegen. Ihr Verhalten in der Gelfiltration an Sephadex G 25 [Ausschlußgrenze: 5000 (Lit. 60)] bewies, daß ihr Molekulargewicht unter 5000 lag.

b) Auftrennung der einzelnen Peptidgemische

In Vorversuchen wurde der Ladungszustand der vorliegenden Peptide bei verschiedenen pH-Werten an Hand ihres elektrophoretischen Verhaltens ermittelt und dementsprechend die zweckmäßigsten Bedingungen für ihre Trennung durch Chromatographie an Ionenaustauschern gewählt. Die Peptidgemische T_{1-2} und T_{3-6} wurden auf DEAE-Sephadex-Säulen fraktioniert (Abb. 40 und 41), während das Gemisch T_7 auf einer SE-Sephadex-Säule chromatographiert wurde (Abb. 42). Der Verlauf der Elution der Säulen wurde mit der Ninhydrinreaktion nach (Lit. 41, 42, 23) und durch Messung der Radioaktivität verfolgt. Die Fraktionen der einzelnen Gipfel wurden in der eingezeichneten Weise (schraffierte Flächen) vereinigt. Die Ausbeuten betrugen, bezogen auf die jeweils zur Chromatographie eingesetzte Radioaktivität: $T_{1-2} = 71\%$ (Abb. 40); $T_3 = 48\%$, $T_{4-6} = 23\%$ (Abb. 41); $T_{3-6} = 38\%$, $T_7 = 46\%$ (Abb. 42). Die Peptidgemische T_3 und T_{4-6} ließen sich am Ionenaustauscher nicht restlos voneinander trennen. Ihre vollständige Trennung gelang erst mit Hilfe der Papierelektrophorese (vgl. Tab. 12-13, S. 55-56).

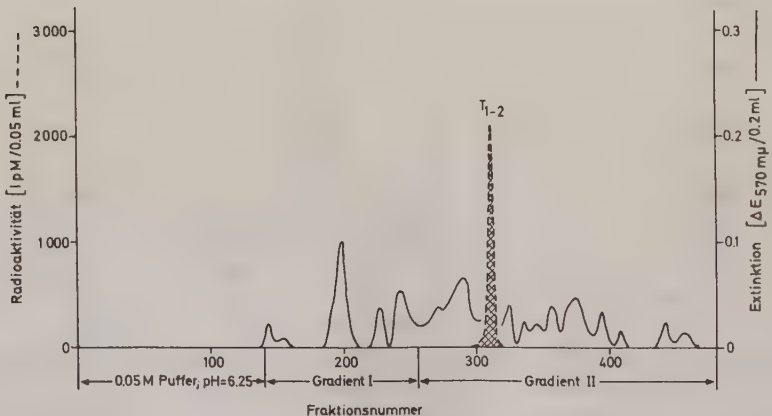


Abb. 40. Chromatographie des Peptidgemisches T_{1-2} an DEAE-Sephadex.

Säule 3,6-199 cm; Probevolumen: 10 ml; Start: 0,05 M Pyridin-Acetat, pH 6,25; Gradient I: + 0,75 M Pyridin-Acetat, pH 5,0; Gradient II: + 2 M Pyridin-Acetat, pH 4,0; Mischvolumen: konst. 2 l; Fraktionsvolumen: 15 ml.

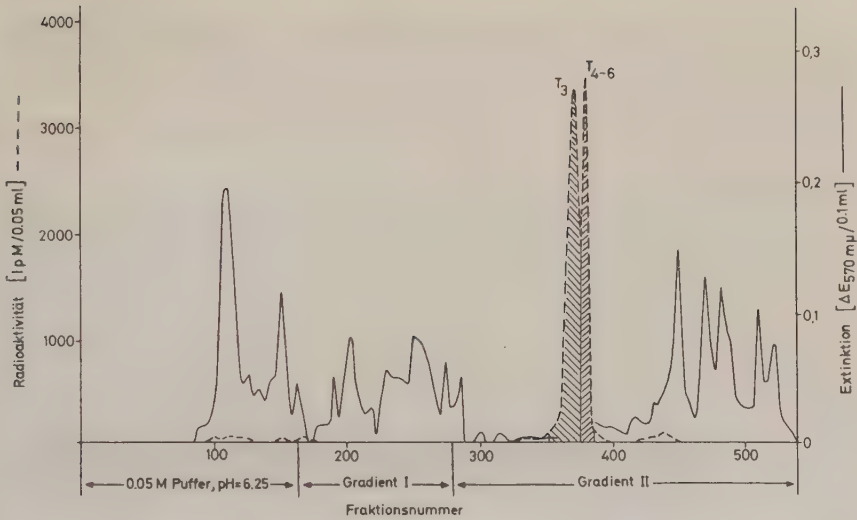


Abb. 41. Chromatographie des Peptidgemisches T_{3-6} an DEAE-Sephadex.

Säule: 4,3·200 cm; Probevolumen: 10 ml; Start: 0,05 M Pyridin-Formiat, pH 6,25; Gradient I: + 0,75 M Pyridin-Formiat, pH 5,0; Gradient II: + 2 M Pyridin-Formiat, pH 4,0; Mischvolumen: konst. 2 l; Fraktionsvolumen: 15 ml.

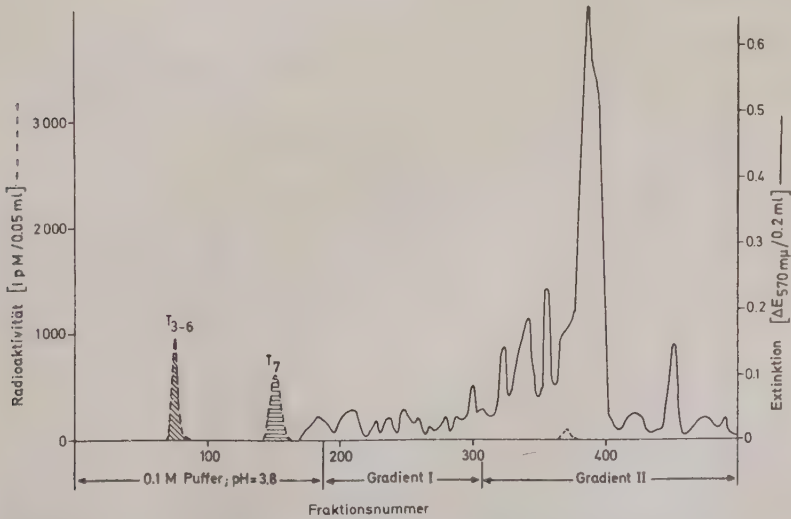


Abb. 42. Chromatographie des Peptidgemisches T_7 (T_{3-6})^{†)} an SE-Sephadex.

Säule: 3,6·200 cm; Probevolumen: 20 ml; Start: 0,1 M Pyridin-Acetat, pH 3,8; Gradient I: + 1 M Pyridin-Acetat, pH 4,8; Gradient II: + 2 M Pyridin-Acetat, pH 5,5; Mischvolumen: konst. 2 l; Fraktionsvolumen: 15 ml.

^{†)} Die in Klammern stehende Bezeichnung T_{3-6} weist darauf hin, daß in T_7 noch ein Anteil von T_{3-6} enthalten ist (vgl. Abb. 37, S. 49).

Zur weiteren Auftrennung der Peptidgemische benutzten wir die Papierelektrophorese und die Papierchromatographie (s. dazu auch S. 35). Die Einzelheiten der elektrophoretischen und chromatographischen Trennoperationen sind in den Tab. 11-13 zusammengestellt. Abb. 43 zeigt ein typisches, bei diesen Versuchen zur Lokalisierung radioaktiver Banden aufgenommenes Radioautogramm.

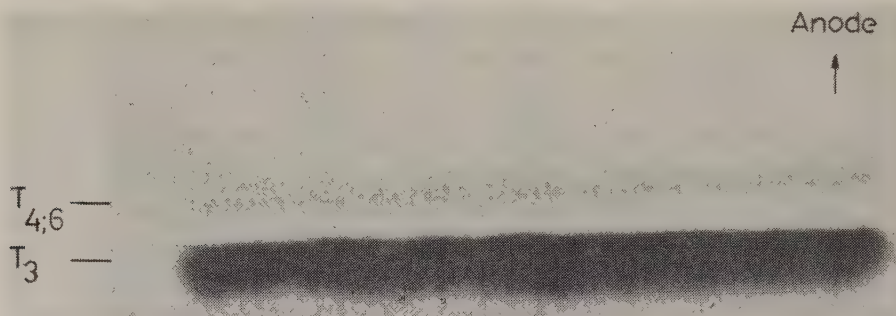


Abb. 43. Trennung der $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide T_3 und $\text{T}_{4,6}$ durch Papierelektrophorese bei pH 6,4 (vgl. Tab. 13, S. 56).

Wiedergabe des zur Lokalisierung der getrennten radioaktiven Banden aufgenommenen Radioautogramms. (Ausführung s. S. 102).

Tabelle 11. Trennungsgang für das Peptidgemisch T_{1-2} .

Trenn- methode	$[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide		nicht-radioaktive Peptide	
	Peptid	m [$\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$]	m [$\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$]	Farbe
1. PE, pH 3,5	T_{1-2} (51%)	$0,6 \cdot 10^{-5}$ Ka	$3,1 \cdot 10^{-5}$ An	violett
			$0,8 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$1,0 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$1,4 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$1,6 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$1,8 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$2,0 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$3,9 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$4,0 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$4,3 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
			$5,4 \cdot 10^{-5}$ Ka	"
2. PE, pH 6,4	T_1 (51%)	$4,5 \cdot 10^{-5}$ An	$1,1 \cdot 10^{-5}$ Ka $1,3 \cdot 10^{-5}$ Ka	violett "
	T_2 (8%)	$7,0 \cdot 10^{-5}$ An		

Erläuterungen s. Legende Tab. 7, S. 36.

Tabelle 12 Trennungsgang für das Peptidgemisch T₄₋₆ (T₃)^a

Trenn- methode	[¹⁴ C]Acetyl-Peptide			nicht-radioaktive Peptide		
	Peptid	m [cm ² /V · sec]	R _f	m [cm ² /V · sec]	R _f	Farbe
1. PE, pH 3,5	T ₃ ^b	1,5 · 10 ⁻⁵ An		0,5 · 10 ⁻⁵ An		violett
	T ₄₋₆ ^b	1,8 · 10 ⁻⁵ An		0,8 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				0,9 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				1,1 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				1,7 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				2,5 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				2,8 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				3,2 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				3,4 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				4,0 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				4,7 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				5,3 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				5,9 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				6,2 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				6,6 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				7,4 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				7,8 · 10 ⁻⁵ Ka		"
				8,4 · 10 ⁻⁵ Ka		"
2. PE, pH 6,4	T ₃ (9%) ^c	3,8 · 10 ⁻⁵ An		0,7 · 10 ⁻⁵ Ka		violett
	T _{4;6} (54%) ^c	4,4 · 10 ⁻⁵ An				
	T ₅ (3%) ^c	4,8 · 10 ⁻⁵ An				
3. PE, pH 1,9	T _{4;6} (85%)	0,6 · 10 ⁻⁵ An		1,2 · 10 ⁻⁵ Ka		violett
4. PC, Lsgm. E	T ₄ (75%)		0,61		0,09	violett
	T ₆ (4%)		0,81		0,18	gelb

^a Die in Klammern stehende Bezeichnung T₃ weist darauf hin, daß in T₄₋₆ noch ein Anteil von T₃ enthalten ist (vgl. Abb. 41, S. 53).

^b Banden wurden zusammen eluiert, da keine ausreichende Trennung erzielt worden war.

^c Endausbeute nach Trennverfahren 1 und 2.

Weitere Erläuterungen vgl. Legende Tab. 7, S. 36.

Tabelle 13. Trennungsgang für das Peptidgemisch T₃(T₄₋₆)^a.

Trenn- methode	[¹⁴ C]Acetyl-Peptide		nicht-radioaktive Peptide	
	Peptid	m [cm ² /V · sec]	m [cm ² /V · sec]	Farbe
1. PE, pH 3,5	T ₃ ^b	1,6 · 10 ⁻⁵ An	1,9 · 10 ⁻⁵ Ka	gelb
	T ₄₋₆ ^b	1,9 · 10 ⁻⁵ An	2,9 · 10 ⁻⁵ Ka	violett
			4,2 · 10 ⁻⁵ Ka	"
			5,1 · 10 ⁻⁵ Ka	"
			6,2 · 10 ⁻⁵ Ka	"
			6,8 · 10 ⁻⁵ Ka	"
			7,6 · 10 ⁻⁵ Ka	"
			8,0 · 10 ⁻⁵ Ka	"
2. PE, pH 6,4	T ₃ (67%) ^c	3,7 · 10 ⁻⁵ An	1,4 · 10 ⁻⁵ Ka	violett
	T _{4,6} (2%) ^c	4,3 · 10 ⁻⁵ An		

^a Die in Klammern stehende Bezeichnung T₄₋₆ weist darauf hin, daß in T₃ noch ein Anteil von T₄₋₆ enthalten ist (vgl. Abb. 41, S. 53).

^b Peptide wurden zusammen eluiert, da keine ausreichende Trennung erzielt worden war.

^c Endausbeute nach Trennverfahren 1 und 2.

Weitere Erläuterungen vgl. Legende Tab. 7, S. 36.

Die zur Trennung der tryptischen [¹⁴C]Acetyl-Peptide durchgeführten Operationen sind in Abb. 44 schematisch zusammengefaßt. Der Anteil der einzelnen Peptide an der Gesamtmenge der in Lösung gebrachten [¹⁴C]Acetyl-Peptide wird näherungsweise durch die in Klammern stehenden Prozentzahlen wiedergegeben.

Zu unserer Überraschung stellte sich bei einer Überprüfung der Peroxydationsstabilität der vorliegenden Peptide heraus, daß die Peptide T₁ und T₇ die radioaktive Essigsäure in einer Bindung enthielten, die mit Perameisensäure spaltbar war (Tab. 14).

Bei T₁ und T₇ mußte es sich somit um [¹⁴C]Acetylthioester-Peptide handeln (Lit. 37, 18).

Wie die Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung ergab, enthielt T₁ neben Verunreinigungen die Aminosäure β-Alanin (1,31 Mol/Mol [¹⁴C]Acetyl-Peptid) und das Amin Cysteamin (bestimmt als Taurin, 1,39 Mol/Mol [¹⁴C]Acetyl-Peptid). Dieser Befund kennzeichnete T₁ als einen Thioester der "zentralen" SH-Gruppe (Lit. 22, 18).

T₇ war noch stark mit nicht-radioaktiven Peptiden verunreinigt. Nach Totalhydrolyse wurde Cysteinsäure, jedoch kein β-Alanin oder Taurin gefunden.

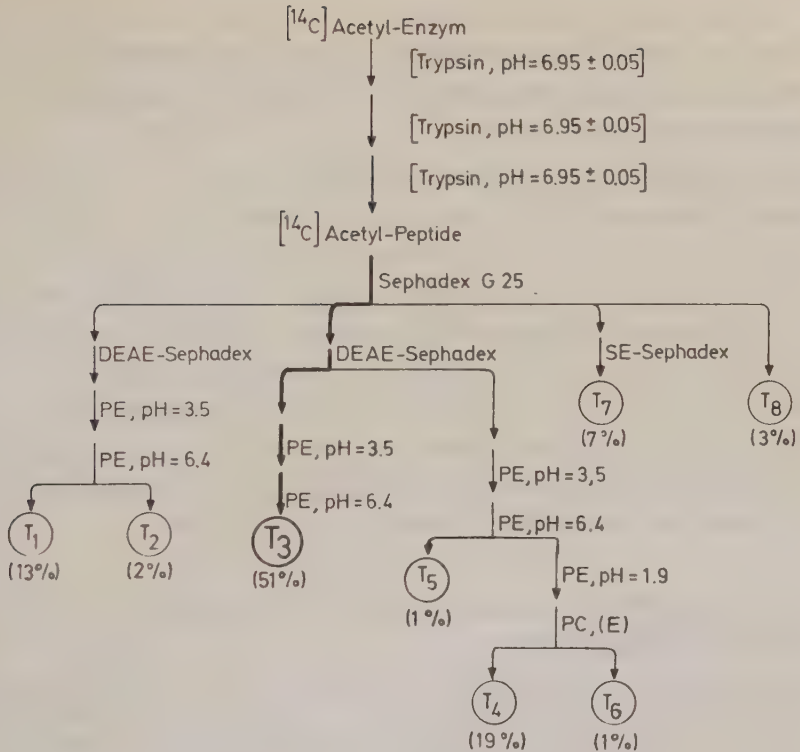


Abb. 44, Trennungsgang für die tryptischen $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide.

Erläuterungen vgl. Text und Legende Abb. 31, S. 39.

Tabelle 14. Thioesteranalyse für die tryptischen $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide.

Peptid	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
Stabile Radioaktivität	5 %	95 %	97 %	98 %	97 %	96 %	6 %	98 %
Thioester	+	-	-	-	-	-	+	-

Ausführung der Thioesteranalyse nach (Lit. 37, 23).

Das beobachtete Auftreten der $[^{14}\text{C}]$ Acetylthioester-Peptide zeigte, daß Ellman's Reagenz unter den von uns gewählten Bedingungen zwar die Fettsäuresyntheseaktivität der Synthetase vollständig hemmte (vgl. z.B. S. 99), die Beladung von SH-Gruppen des

Enzymkomplexes mit [^{14}C]Acetylresten indessen nicht ganz verhinderte. Der Anteil der Thioester an der Gesamtmenge der [^{14}C]Acetyl-Peptide lag bei den einzelnen Beladungsversuchen zwischen 7 und 20%.

Von den peroxydationsstabilen [^{14}C]Acetyl-Peptiden beanspruchte das Peptid T_3 unser besonderes Interesse. Es vereinigte mit Abstand den größten Anteil der Radioaktivität (51%, Vgl. Abb. 44, S. 57) auf sich, was wir als ein Kriterium für seine Herkunft aus dem aktiven Zentrum der Transferase ansahen (vgl. S. 87). Das Peptid lag nach den oben geschilderten Trennoperationen mit hoher Ausbeute (543 nMol) in ausreichender Reinheit vor (vgl. Tab. 15). Damit hatten sich unsere Erwartungen erfüllt, die wir an die Verwendung von Trypsin zur Spaltung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms geknüpft hatten. Wir hatten ein peroxydationsstabiles [^{14}C]Acetyl-Peptid in einer Ausbeute isoliert, die um den Faktor 7 größer war als die höchsten Ausbeuten, mit denen wir ein entsprechendes peptisches Spaltstück in reiner Form gewinnen konnten.

6. Struktur des tryptischen [^{14}C]Acetyl-Peptids T_3 und seine Position in der Sequenz des Enzyms

a) Aminosäurezusammensetzung des Peptids und seine Position in der Enzymsequenz

Die in Tab. 15 zusammengestellten Ergebnisse der Aminosäureanalyse charakterisieren T_3 als ein [^{14}C]Acetyl-Octapeptid der Zusammensetzung



Das Peptid enthielt keine basischen Aminosäuren. Da es unter der Einwirkung von Trypsin entstanden war, zogen wir aus diesem Befund den Schluß, daß es vom freien Carboxylende einer Polypeptidkette des Enzyms stammt. Wie schon früher ausgeführt (vgl. S. 30), hydrolysiert Trypsin Peptidbindungen nur an der Carboxylgruppe der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Das hat zur Folge, daß alle Spaltstücke, die es aus dem Inneren einer Polypeptidkette freisetzt, entweder Arginin oder Lysin am Carboxylende tragen. Nur für das vom freien Carboxylende der Kette stammende Spaltstück besteht die Möglichkeit, einen arginin- und lysin-freien C-Terminus zu besitzen.

Um sicherzustellen, daß die Entstehung des Peptids T_3 nicht auf die Wirkung einer chymotryptischen Verunreinigung in dem zur Spaltung der [^{14}C]Acetyl-Synthetase verwendeten Trypsin (Chymotrypsingehalt $< 2\%$) zurückzuführen war, wiederholten wir die

Tabelle 15. Aminosäureanalyse des $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptids T₃.

Aminosäure	Aminosäurereste/Molekül $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptid	
Lys	-	
His	-	
Arg	-	
Asp	-	
Thr	1,14 ^a	(1)
Ser	1,10 ^a	(1)
Glu	1,12	(1)
Pro	-	
Gly	1,08	(1)
Ala	1,07	(1)
Cys	-	
Val	2,18	(2)
Met	-	
Ile	-	
Leu	1,15	(1)
Tyr	-	
Phe	-	
Trp	-	
β -Ala	-	

^a Werte wurden nicht korrigiert.

^b Tryptophanbestimmung mit Ehrlich's Reagenz (Lit. 45) und nach (Lit. 61). Die angenommene Anzahl der Aminosäurereste ist in Klammern gesetzt. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 104.

gemisch einer präparativen Papierelektrophorese (pH 6,4) unterworfen. Es gelang so, das Gemisch in fünf radioaktive Peptide aufzutrennen, von denen zwei (T_I und T_{II}) die Hauptmenge der Radioaktivität trugen (Tab. 16).

Tabelle 16. Papierelektrophorese der $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide des schraffierten Gipfels von Abb. 45, S. 60.

$[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide	T _I	T _{II}	T _{III}	T _{IV}	T _V
m	$4,4 \cdot 10^{-5}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$	$7,3 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$
$[\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}]$	An	An	An	An	An
Ausbeute ^a	41 %	18 %	2 %	8 %	6 %

^a Die Ausbeute wurde auf die zur Elektrophorese eingesetzte Gesamtradioaktivität bezogen. Die Elektrophorese wurde bei pH 6,4 durchgeführt. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 102.

⁺⁾ Eigenschaften des eingesetzten $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms s. S. 27, Tab. 5, Präparat Nr. 7.

Verdauung unter Benutzung eines DCC-behandelten Trypsins (Chymotrypsin-gehalt < 0,11 %). Wie schon bei den früheren Spaltversuchen (vgl. S. 49) beobachteten wir, daß das in das Experiment eingesetzte $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzym^{+) durch einmalige Trypsin-Behandlung etwa zur Hälfte (58 %) in lösliche $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide umgewandelt wurde. Die Bedingungen des Versuchs entsprachen denen der Spaltoperationen von S. 49. Die erhaltenen Peptide, von denen 13 % $[^{14}\text{C}]$ Acetylthioester waren, filterierten wir nach Entfernung des Ungelösten über Sephadex G 25 (Abb. 45, S. 60).}

Die Fraktionen des Eluats wurden in der angegebenen Weise (schraffierte Fläche) vereinigt. Sie enthielten 61 % der zur Gel-filtration eingesetzten Radioaktivität in peroxydationsstabiler Form. Zur weiteren Aufspaltung wurde das vorliegende Peptid-

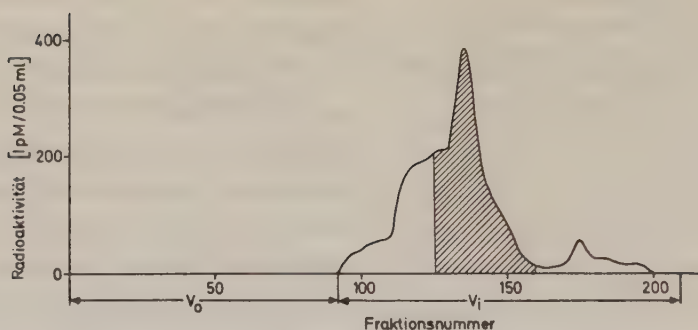


Abb. 45. Sephadex-G25-Filtration der nach Spaltung von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäure-synthetase mit DCC-behandeltem Trypsin vorliegenden löslichen Peptide.

Spaltansatz: 150 mg [^{14}C]Acetyl-Enzym. Weitere Einzelheiten s. S. 100.

Säule: 2,3·196 cm; Probevolumen: 20 ml; Eluant: 5proz. Essigsäure; Durchfluß: 32 ml/h; Fraktionsvolumen: 3,4-3,5 ml.

Die Peptide T_I und T_II wurden nach ihrer Elution vom Pherogramm durch Papier-elektrophorese und Dünnschichtchromatographie mit den Peptiden T_3 und T_4 der früheren Spaltversuche verglichen. Tab. 17 zeigt, daß einerseits die Peptide T_I und T_3 und andererseits die Peptide T_II und T_4 in ihren Mobilitäten und R_f -Werten übereinstimmen. Zwischen den entsprechenden Peptiden bestand ferner Identität in ihrem Verhalten bei der alkalischen Hydrolyse (vgl. Abb. 65, S. 86).

Tabelle 17. Papierelektrophoretischer und dünnschichtchromatographischer Vergleich der [^{14}C]Acetyl-Peptide T_I und T_II mit den [^{14}C]Acetyl-Peptiden T_3 und T_4 .

[^{14}C]Acetyl-Peptid	Papierelektrophorese		Dünnschichtchromatographie
	pH 6,4	pH 3,5	Lsgm. E ^a
	m [$\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$]	m [$\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$]	R_f
T_I	$3,8 \cdot 10^{-5}$ An	$1,4 \cdot 10^{-5}$ An	0,82
T_3	$3,8 \cdot 10^{-5}$ An	$1,4 \cdot 10^{-5}$ An	0,82
T_II	$4,3 \cdot 10^{-5}$ An	$1,9 \cdot 10^{-5}$ An	0,74
T_4	$4,3 \cdot 10^{-5}$ An	$1,9 \cdot 10^{-5}$ An	0,74

^a Zusammensetzung des Lösungsmittelsystems s. Tab. 28, S. 104.

Experimentelle Einzelheiten s. S. 102 ff.

Mit dem Ergebnis dieses Versuches sahen wir es als erwiesen an, daß die Entstehung des Peptids T₃ nicht der Wirkung von Chymotrypsin zuzuschreiben war. Der Befund bestärkte uns in der Ansicht, daß das Peptid im Enzym am Carboxylende steht. Auf die Identität zwischen den Peptiden T_{II} und T₄ werden wir in Kapitel B, III, 8. zurückkommen.

b) Sequenz des Peptids

Die Aufklärung der Sequenz des Peptids T₃ wurde beträchtlich durch den Umstand erschwert, daß das Peptid keine freie Aminoendgruppe besaß. Den ersten Anhaltspunkt hierfür erhielten wir bei dem Versuch, die N-terminale Aminosäure mit Hilfe der empfindlichen Dansylchlorid-Methode (Lit. 46, 47) zu bestimmen. Nach Behandlung des Peptids mit Dansylchlorid und anschließender salzsaurer Hydrolyse des Produkts konnten wir keine Dansyl-Aminosäure nachweisen (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 105).

Wir versuchten daraufhin, das Peptid nach Edman (Lit. 62, 63) abzubauen. Zur Identifizierung der endständigen Aminosäuren bedienten wir uns hierbei der subtraktiven Methode von Königsberg (Lit. 64). Tab. 18 zeigt das Resultat des Abbaubersuchs: Alle Aminosäuren des Ausgangsmaterials waren nach der Durchführung der Abbaupoperation und einem geeigneten Extraktionsschritt noch vorhanden.

Tabelle 18. Versagen des Edman-Abbaus für Peptid T₃.

Aminosäure	Aminosäure-zusammensetzung		Edman-Abbau 1.Stufe	
	Aminosäurereste/Molekül		[¹⁴ C]Acetyl-Peptid	
Thr	1,14	(1)	1,09	(1)
Ser	1,10	(1)	0,96	(1)
Glx	1,12	(1)	1,16	(1)
Gly	1,08	(1)	1,11	(1)
Ala	1,07	(1)	1,02	(1)
Val	2,18	(2)	2,22	(2)
Leu	1,15	(1)	1,12	(1)

Die in Klammern stehenden Werte geben die angenommene Zahl der Aminosäurereste wieder. Einzelheiten vgl. Exp. Teil, S. 106.

Schließlich prüften wir noch, ob mit Leucinaminopeptidase eine Spaltung des Peptids zu erzielen war. Leucinaminopeptidase baut Peptide vom freien Aminoende her ab,

wobei unter energischen Bedingungen alle L-Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin in Freiheit gesetzt werden (Lit. 65-67). Wir versetzten das Peptid T₃ mit 4% aktiver Leucinaminopeptidase und beobachteten auch nach vierstündiger Inkubation bei pH 8,0 und 40°C kein Auftreten von Aminosäuren (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 106).

Aus diesen Ergebnissen folgte, daß im Peptid keine freie Aminoendgruppe vorhanden war.

Wegen der Blockierung des Aminoendes konnten wir nun alle Methoden zum stufenweisen Abbau des Peptids und damit zur Ermittlung seiner Sequenz, die ihren Ausgang vom Aminoende nehmen, nicht anwenden. Insbesondere vom Edman-Abbau, der bewährtesten Methode zur Sequenzbestimmung (Lit. 38, 63, 64) war, wie bereits mitgeteilt, nicht Gebrauch zu machen. Als einziger Ansatzpunkt für die Durchführung der Sequenzanalyse bot sich uns das Carboxylende des Peptids an.

Von den bekannten Verfahren, die die Ermittlung der Sequenz vom Carboxylende her erlauben (Lit. 38, 68-70) schien uns, in Anbetracht der zur Verfügung stehenden geringen Substanzmengen, nur der enzymatische Abbau mit Carboxypeptidasen erfolgversprechend zu sein. Die Carboxypeptidasen spalten aus Peptiden sukzessiv die C-terminalen Aminosäuren ab (Lit. 71-73). Durch Messung der Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Aminosäuren in Freiheit gesetzt werden, können in günstigen Fällen Informationen über die Reihenfolge ihrer Verknüpfung erhalten werden (Lit. 72).

Man kennt drei Carboxypeptidasen von unterschiedlicher Spezifität: Carboxypeptidase A, B und C (Lit. 72). Wir entschieden uns im Hinblick auf die Aminosäurezusammensetzung des Peptids T₃ für die Anwendung von Carboxypeptidase A (CPA), die, wie man aus zahlreichen Beobachtungen weiß, besonders rasch unpolare, aliphatische Seitenketten tragende Aminosäuren aus einem Peptidverband herauslöst (Lit. 72). Da Aminosäuren dieser Art die Hauptbestandteile des Peptids T₃ waren, lag die Vermutung nahe, daß mit Carboxypeptidase A ein Abbau des Peptids zu erreichen war.

Im Versuch von Abb. 46 wurde das Peptid T₃ bei 37°C mit 3% CPA behandelt und die Freisetzung der Aminosäuren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen.

Die Abb. läßt erkennen, daß aus dem Octapeptid in schneller Reaktion die Aminosäuren Alanin, Leucin, Threonin und Valin (2) abgespalten wurden. Anschließend wurden in langsamer Reaktion und mit nicht unterscheidbarer Geschwindigkeit Glycin und Serin/ Glutamin [†]) freigesetzt. Der Versuch lieferte den ersten Hinweis auf die Position von

[†]) Wir konnten in der automatischen Aminosäureanalyse nach (Lit. 56, 57) zunächst nicht unterscheiden, ob Serin oder Glutamin im Peptid enthalten war, da beide Aminosäuren im Eluat in derselben Position erschienen. Über die Klärung dieser Frage wird auf S. 67 berichtet.

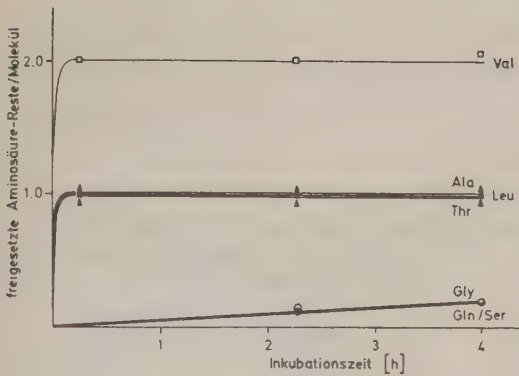
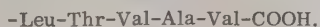


Abb. 46, Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von Aminosäuren aus Peptid T₃ durch Einwirkung von CPA.

Ansatz: 40 nMol Peptid T₃; Enzym/ Substrat-Verhältnis: 1/33; Inkubationstemperatur: 37°C. Weitere Einzelheiten vgl. Exp. Teil, S. 106.

Glycin und Serin/Glutamin in der Sequenz des Peptids. Glycin unterscheidet sich von den übrigen Aminosäuren charakteristisch durch seine große Resistenz gegenüber der Einwirkung von Carboxypeptidase A (Lit. 72). Im Peptidverband blockiert es daher den stufenweisen Abbau des Peptids durch das Enzym. Die Freisetzung der ihm nachfolgenden Aminosäuren erlaubt es nur in dem Maße, wie es selbst abgespalten wird. Sind diese Aminosäuren leichter durch CPA hydrolysierbar als Glycin, so führt das dazu, daß in dem Augenblick, in dem ein Glycin freigesetzt worden ist, sofort die nächstfolgende Aminosäure abgespalten wird. Daraus resultiert ein Zusammenfallen der kinetischen Kurven, wie es in Abb. 46 für die Glycin- und die Serin/Glutamin-Kurve beobachtet wurde. Aus dem Ergebnis des Versuchs konnte somit geschlossen werden, daß Glycin in der Sequenz des Peptids T₃ vom Carboxylende aus betrachtet, auf die Aminosäuren Alanin, Leucin, Threonin und zwei Valin folgte, und daß es mit Serin/Glutamin verknüpft war.

Eine Behandlung des Peptids mit CPA unter milderen Bedingungen (0.5% CPA, 25°C) als im obigen Versuch ermöglichte es, die Reihenfolge zu ermitteln, in der die fünf leicht abspaltbaren Aminosäuren miteinander verbunden waren (Abb. 47). Aus der Abb. ist zu ersehen, daß als erste Aminosäure Valin freigesetzt wurde. Valin nahm somit im Peptid die C-terminale Position ein. Dann erfolgte nacheinander die Freisetzung der Aminosäuren Alanin, Valin, Threonin und Leucin. Die kinetischen Daten ließen den Schluß zu, daß die Aminosäuren im Peptid in der nachfolgenden Weise aneinandergereiht waren:



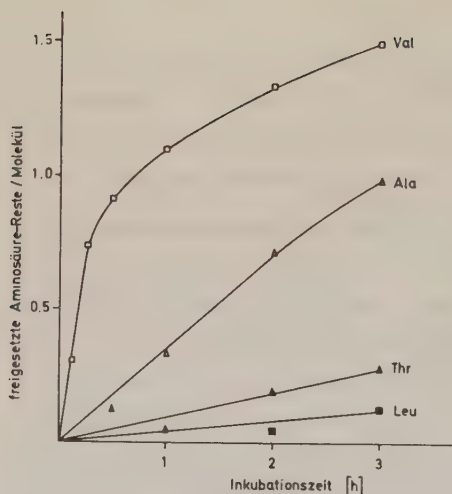
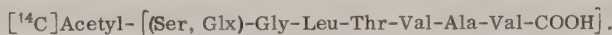


Abb. 47. Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von Aminosäuren aus Peptid T₃ durch Einwirkung von CPA.

Ansatz: 50 nMol Peptid T₃; Enzym / Substrat-Verhältnis: 1/200; Inkubationstemperatur: 25°C. Weitere Einzelheiten vgl. Exp. Teil, S. 106.

Aus diesen Ergebnissen folgte für das Peptid T₃ die Teilstruktur:



Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen wandten wir uns der Aufgabe zu, die Bindungsstelle des [¹⁴C]Acetylrestes im Peptid zu lokalisieren. Für dieses Vorhaben benötigten wir eine Methode, die es erlaubte, das Peptid in seine Bestandteile zu zerlegen, ohne dabei die Bindung der radioaktiven Essigsäure an ihre Akzeptorgruppe zu spalten. Es lag nahe, hierzu wieder die Verdauung des Peptids mit Carboxypeptidase A anzuwenden, von der wir bereits wußten, daß sie zu einem weitgehenden Abbau der Verbindung führte. Um zu prüfen, ob die [¹⁴C]Acetyl-Akzeptor-Bindung während des Spaltprozesses erhalten blieb, inkubierten wir das Peptid mit verschiedenen Mengen von CPA und bestimmten den nach dem Ansäuern der Reaktionsgemische vorliegenden flüchtigen Teil der Radioaktivität ([¹⁴C]Essigsäure). Dabei zeigte sich, daß selbst unter den energischen, zu einer tiefgreifenden Spaltung des Peptids führenden Bedingungen des Versuchs von Abb. 46, S. 63, keine radioaktive Essigsäure freigesetzt wurde. Die Verdauung mit CPA war mithin als eine geeignete Methode anzusehen, das Peptid T₃ ohne Verlust an Radioaktivität abzubauen. Wir gingen deshalb dazu über, die beim Abbau entstehenden Produkte im präparativen Maßstab zu isolieren.

In einem ersten Ansatz inkubierten wir das Peptid T₃ mit 3% CPA bei einer Temperatur von 37°C. Die Dauer des Versuchs beschränkten wir vorerst auf 30 min, um eine Verunreinigung der Probe durch Autolyseprodukte der Carboxypeptidase zu vermeiden.

Den Spaltansatz fraktionierten wir zur Abtrennung des Enzyms und zur Abschätzung der Größe der Spaltprodukte über eine Sephadex-G 25-Säule. Das in Abb. 48 wiedergegebene Elutionsdiagramm zeigt, daß aus dem [^{14}C]Acetyl-Octapeptid, dessen Molekulargewicht (815.9) oberhalb der Ausschlußgrenze des Gels [700 (Lit. 60)] lag, eine wesentlich kleinere radioaktive Verbindung (T_3C_1) entstanden war, die (nach der Gelfiltration) 91% der zur Spaltung eingesetzten Radioaktivität enthielt.

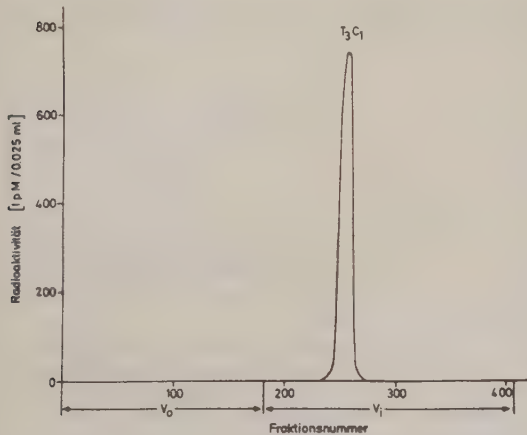
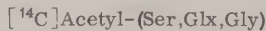


Abb. 48. Sephadex-G10-Filtration des aus Peptid T_3 durch CPA-Abbau erhaltenen Spaltprodukts T_3C_1 .
Spaltansatz: 37 nMol Peptid T_3 ; Enzym / Substrat-Verhältnis: 1/33; Inkubation: 30 min bei 37°C . Weitere Einzelheiten vgl. S. 106, 107.
Säule: $2,5 \times 157$ cm; Probevolumen: 1,5 ml; Eluant: 5proz. Essigsäure; Durchfluß: 17 ml/h; Fraktionsvolumen: 1,7 ml.

Wie die Aminosäureanalyse ergab, war die Substanz trotz der kurzen Einwirkung von CPA und der anschließenden Gelfiltration noch mit Peptidmaterial der Carboxypeptidase verunreinigt. Sie wurde daher zusätzlich einer papierelektrophoretischen Reinigungsoperation (pH 6,4) unterworfen. Erst dann erwies sie sich in der Aminosäureanalyse als rein (Tab. 19, S. 68). Die Analysenergebnisse belegten, daß es sich bei der Verbindung um ein [^{14}C]Acetyl-Tripeptid der Zusammensetzung



handelte. Dieser Befund bestätigte die Schlußfolgerungen, die wir aus den Ergebnissen der kinetischen Analyse von Abb. 47 auf den Aufbau des [^{14}C]Acetyl-Octapeptids T_3 gezogen hatten. Die Carboxypeptidase hatte in rascher Reaktion vom Carboxylende des Peptids her die Aminosäuren Valin, Alanin, Valin, Threonin und Leucin abgespalten. Der Abbau war zum Stillstand gekommen, nachdem Glycin in die C-terminale Position gerückt war und die weitere Spaltung erschwerte.

Nach den Ergebnissen der kinetischen Untersuchung von Abb. 46, S. 63, war jedoch bereits zu erwarten, daß ein kleiner Teil der CPA-Moleküle bei genügend langer Inkubation fähig war, die durch das Glycin gesetzte Hürde zu überspringen und den Abbau fortzusetzen, wobei noch kleinere radioaktive Bruchstücke des Peptids T_3 entstehen sollten. Wir wiederholten daher den Spaltversuch unter Verlängerung der Inkubationszeit und Erhöhung der Enzymkonzentration. Abb. 49 zeigt das Resultat der Gelfiltration eines Spaltansatzes, bei welchem das Peptid T_3 vier Stunden lang mit 10% CPA bei 37°C inkubiert worden war.

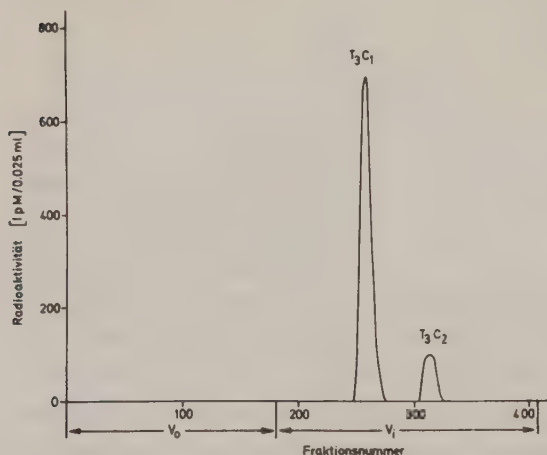


Abb. 49. Sephadex-G10-Filtration der aus Peptid T_3 durch CPA-Abbau erhaltenen Spaltprodukte T_3C_1 und T_3C_2 .

Spaltansatz: 40 nMol Peptid T_3 ; Enzym / Substrat-Verhältnis: 1 / 10; Inkubation: 4 h bei 37°C. Weitere Einzelheiten vgl. S. 106, 107.

Gelfiltration wie bei Abb. 48.

Aus dem Elutionsdiagramm ist ersichtlich, daß erwartungsgemäß der Abbau des Octapeptids T_3 in erster Linie zur Bildung des schon bekannten Tripeptids T_3C_1 geführt hatte. Der große Gipfel, der 76% der zur Spaltung gekommenen Radioaktivität enthielt, erschien im Eluat in exakt derselben Position wie der Gipfel des Tripeptids im Versuch von Abb. 48, S. 65. Ferner wanderten beide Substanzen in der Papierelektrophorese bei pH 6,4 und 3,5 mit identischer Geschwindigkeit ($m_{\text{pH } 6,4} = 9,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$; $m_{\text{pH } 3,5} = 3,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$), und eine nach einem elektrophoretischen Reinigungsschritt (pH 6,4) vorgenommene Aminosäureanalyse bewies dieselbe Aminosäurezusammensetzung (Tab. 19, S. 68).

Neben diesem Tripeptid war jedoch in geringer Ausbeute ein kleineres radioaktives Abbauprodukt (T_3C_2) entstanden, welches 12% der in das Experiment eingesetzten Radioaktivität auf sich vereinigte. Wir durften von dieser Substanz annehmen, daß sie aus dem Tripeptid T_3C_1 unter der Wirkung der Carboxypeptidase hervorgegangen war.

Abb. 50 bestätigte dies. Sie gibt das Ergebnis eines Versuchs wieder, bei dem wir das Peptid T_3 unter den Bedingungen des Experiments von Abb. 49 mit Carboxypeptidase A behandelten und die Konzentration der resultierenden Spaltstücke T_3C_1 und T_3C_2 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmten.

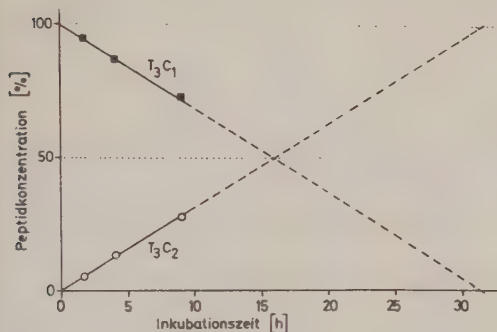


Abb. 50. Umwandlung des Spaltproduktes T_3C_1 in das Spaltprodukt T_3C_2 durch Einwirkung von CPA.

Spaltansatz: 10 nMol Peptid T_3 ; Enzym/Substrat-Verhältnis: 1/10; Inkubationstemperatur: 37°C. Aufarbeitung der Proben durch Papierelektrophorese bei pH 6,4. Auswertung der Pherogramme im Radiopapierchromatograph und durch Auszählen der radioaktiven Bereiche unter Szintillator-Flüssigkeit. Weitere Einzelheiten vgl. S. 106.

Eine Extrapolation der Ergebnisse zeigte, daß das Enzym das $[^{14}C]$ Acetyl-Tripeptid T_3C_1 bei längerer Einwirkung restlos in die radioaktive Verbindung T_3C_2 umwandelte. Dieser Substanz kam somit eine Schlüsselposition bei der weiteren Strukturaufklärung zu; denn sie stellte das kleinste radioaktive Spaltstück dar, das wir aus Peptid T_3 erhalten konnten. Ihre chemische Natur blieb uns zunächst verborgen, was darauf zurückzuführen war, daß die Verbindung nach der Gelfiltration und einer bei pH 3,5 durchgeführten Papierelektrophorese noch erheblich mit Autolyseprodukten der Carboxypeptidase verunreinigt war (Tab. 19, S. 68). Eine Fortsetzung der Reinigungsprozedur war aber wegen Substanzmangels nicht möglich. Die entscheidenden Hinweise, die zur Aufklärung der Konstitution der Verbindung führten, erhielten wir durch Untersuchungen, die wir in der Zwischenzeit an ihren Muttersubstanzen, dem Tripeptid T_3C_1 und dem Octapeptid T_3 , vorgenommen hatten.

Wir hatten zunächst die noch offene Frage entschieden, ob durch Einwirkung von CPA auf das Peptid T_3 neben Glycin Serin oder Glutamin freigesetzt wurde (vgl. S. 62). Durch Vergrößerung der normalerweise zur Aminosäureanalyse verwendeten Ionenaustauscherpackung (vgl. S. 104) ließen sich die Aminosäuren Serin und Glutamin im Eluat so weit voneinander trennen, daß sie sicher nebeneinander nachgewiesen werden konnten. Es stellte sich heraus, daß die Carboxypeptidase im Versuch von Abb. 46, S. 63, Glutamin freigesetzt hatte.

Tabelle 19. Aminosäureanalyse der Spaltprodukte T_3C_1 und T_3C_2 .

Aminosäure	$T_3C_1^a$	$T_3C_1^b$	T_3C_2
	Aminosäurereste/Molekül [^{14}C]Acetyl-Verbindung		
Lys	-	-	0,41
His	-	-	-
Arg	-	-	-
Asp	-	-	0,69
Thr	-	-	0,24 ^c
Ser	0,91 ^c (1)	1,06 ^c (1)	1,92 ^c
Glu	1,07 (1)	1,22 (1)	1,11
Pro	-	-	-
Gly	1,09 (1)	1,18 (1)	1,04
Ala	-	-	0,13
Cys	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Val	-	-	-
Met	-	-	-
Ile	-	-	-
Leu	-	-	0,15
Tyr	-	-	-
Phe	-	-	-
Trp	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
β -Ala	-	-	-

^a aus Versuch von Abb. 48, S. 65.

^b aus Versuch von Abb. 49, S. 66.

^c Werte wurden nicht korrigiert.

Die angenommenen Zahl der Aminosäurereste ist in Klammern gesetzt. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 104.

Sodann hatten wir die Kinetik der Abspaltung von Aminosäuren aus dem Tripeptid T_3C_1 durch Carboxypeptidase A untersucht. Wie man erwarten konnte, wurden ebenfalls aus diesem Peptid Glycin und Glutamin langsam und mit nicht unterscheidbarer Geschwindigkeit freigesetzt (Abb. 51).

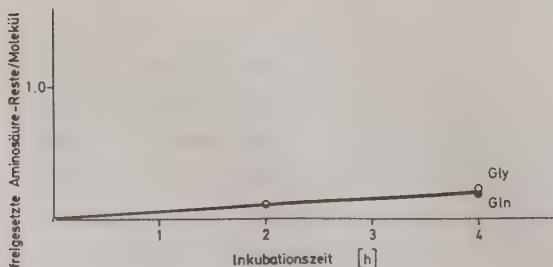
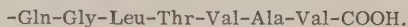


Abb. 51. Zeitlicher Verlauf der Freisetzung von Aminosäuren aus Peptid T_3C_1 durch Einwirkung von CPA.

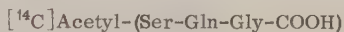
Spaltansatz: 25 nMol Peptid T_3C_1 .
Reaktionsbedingungen vgl. Abb. 46, S. 63.

Die soeben geschilderten Versuchsergebnisse ließen die Schlußfolgerung zu, daß sowohl im Tripeptid als auch im Octapeptid Glycin mit Glutamin verknüpft war (vgl. dazu S. 63).

Auf Grund dieses Befundes standen für das Tripeptid die Positionen von zwei und für das Octapeptid, unter Berücksichtigung früherer Resultate (vgl. S. 64), die Stellungen von sieben Aminosäuren fest:



Aus den obenstehenden Partialformeln ging hervor, daß die einzige, noch nicht in die Sequenz eingeordnete Aminosäure Serin nur die N-terminale Position einnehmen konnte. Für T_3C_1 und T_3 ergaben sich somit die Sequenzen:



Nun hatten die auf S. 61 beschriebenen Versuche den Nachweis erbracht, daß im Peptid T_3 keine freie Aminoendgruppe vorhanden war. Der endständige Serinrest mußte demnach am Stickstoff einen Substituenten tragen. Damit stimmte überein, daß Serin nur nach salzsaurer Totalhydrolyse des Peptids, nicht jedoch nach dessen enzymatischer Spaltung mit CPA nachgewiesen werden konnte. Letztere führte aber, wie der Versuch von Abb. 46, S. 63, bewies, ebenfalls zur Spaltung von allen Bindungen zwischen den vorhandenen Aminosäureresten. Ebendiese vollständige Spaltbarkeit des Peptids durch CPA lieferte einen weiteren Beweis für die Substitution des N-terminalen Serins. Der Abbau eines Peptids durch Carboxypeptidase A kommt gewöhnlich auf der Stufe des Dipeptids zum Stillstand. Eine hohe Dipeptidase-Aktivität zeigt das Enzym nur gegenüber Peptiden, deren Aminoende acyliert ist (Lit. 73).

Welcher Art die Acylierung des N-endständigen Serins war, gab sich durch die Aufklärung der Struktur des Abbauprodukts T_3C_2 zu erkennen. Die Voraussetzung für die Identifizierung der Substanz hatten die im vorstehenden geschilderten Versuche geschaffen. T_3C_2 war aus dem serin-, glutamin- und glycin-haltigen $[^{14}\text{C}]\text{Acetyl-Tripeptid } T_3C_1$ unter der energischen Einwirkung von CPA hervorgegangen (vgl. Abb. 50, S. 67). Bei diesem Vorgang wurden Glycin und Glutamin freigesetzt (vgl. Abb. 51). Wir hatten somit allen Grund zu der Annahme, daß es sich bei dem übrigbleibenden radioaktiven Spaltprodukt T_3C_2 um ein den $[^{14}\text{C}]\text{Acetylrest}$ enthaltendes N-Acylderivat des Serins handelte. Eine Verbindung, die diesen Faktoren gerecht wurde, war $\text{N-}[^{14}\text{C}]\text{Acetyl-serin.}$

Wir synthetisierten die unmarkierte Verbindung und verglichen sie papierelektrophoretisch und dünnschichtchromatographisch mit T_3C_2 . Die in Tab. 20 zusammengestellten Versuchsergebnisse bewiesen die Identität von authentischer Verbindung mit dem isolierten Produkt. Die Auswertung eines typischen Elektropherogramms ist in Abb. 52 wiedergegeben. Sie zeigt die vollkommene Übereinstimmung zwischen der Vergleichssubstanz und der radioaktiven Verbindung.



Abb. 52. Identifizierung des Abbauprodukts T_3C_2 durch Papierelektrophorese bei pH 3,5. Auswertung des Pherogramms im Radiopapierchromatograph und durch Anfärbung mit Chlor/Tolidin nach (Lit. 74). Weitere experimentelle Einzelheiten vgl. S. 102 ff.

Tabelle 20. Papierelektrophoretischer und dünnschichtchromatographischer Vergleich von Abbauprodukt T_3C_2 mit N-Acetyl-serin.

Verbindung	Papierelektrophorese		Dünnschichtchromatographie		
	pH 6,4	pH 3,5	Lsgm. B ^a	Lsgm. D ^a	Lsgm. E ^a
	m [cm ² /V · sec]	m [cm ² /V · sec]	R _f	R _f	R _f
T_3C_2	14,9 · 10 ⁻⁵ An	6,4 · 10 ⁻⁵ An	0,65	0,58	0,61
N-Acetyl-serin	14,9 · 10 ⁻⁵ An	6,4 · 10 ⁻⁵ An	0,65	0,58	0,61

^a Zusammensetzung der Lösungsmittelsysteme s. Tab. 28, S. 104. Experimentelle Einzelheiten s. S. 102 ff.

Nach Aufklärung der Konstitution von T_3C_2 ließen sich die kompletten Strukturformeln für die Peptide T_3 und T_3C_1 aufstellen (Abb. 53).

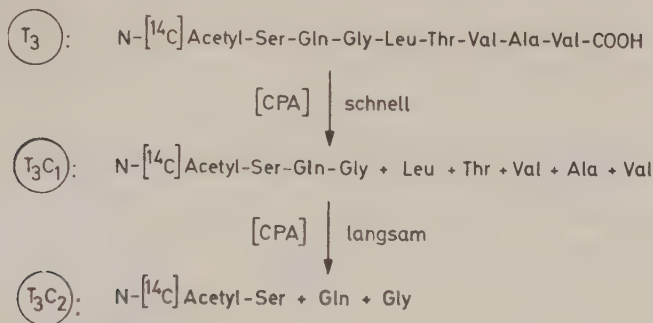


Abb. 53. Struktur des $[^{14}C]$ Acetyl-Peptids T_3 und seiner durch CPA-Abbau erhaltenen Spaltprodukte T_3C_1 und T_3C_2 .

Aus der völligen Spaltbarkeit des Peptids T_3 durch CPA konnte geschlossen werden, daß alle Aminosäuren des Peptids (mit Ausnahme des optisch inaktiven Glycins) die L-Konfiguration besitzen; denn nur L-Aminosäuren werden von Carboxypeptidase A freigesetzt (Lit. 71, 73).

Die für das Tripeptid T_3C_1 ermittelte Konstitution wurde inzwischen von Wünsch und Deimer (Lit. 75) durch Synthese bestätigt. Wie sich herausstellte, war die Sequenz von T_3C_1 zufällig mit einem Abschnitt (Positionen 2-4) der Sequenz des Pankreashormons Glucagon identisch, dessen Totalsynthese von Wünsch (Lit. 76) durchgeführt worden war. Herr Dr. Wünsch und Herr Deimer waren so freundlich, das acetylierte Tripeptid zu synthetisieren und uns zur Verfügung zu stellen, so daß wir das isolierte Peptid mit dem synthetischen Produkt vergleichen konnten.

Tab. 21 zeigt, daß T_3C_1 bei der Papierelektrophorese und bei der Dünnschichtchromatographie zusammen mit der authentischen Verbindung wanderte, Übereinstimmung bestand außerdem im Verhalten der Peptide bei der Einwirkung von CPA. Auch aus der synthetischen Verbindung wurde durch CPA (10%) bei 37°C langsam und mit nicht zu unterscheidender Geschwindigkeit Glycin und Glutamin freigesetzt (Lit. 75) (vgl. dazu Abb. 51, S. 68).

Tabelle 21. Papierelektrophoretischer und dünnschichtchromatographischer Vergleich von [^{14}C]Acetyl-Peptid T_3C_1 mit N-Acetyl-Ser-Gln-Gly-COOH.

Verbindung	Papierelektrophorese		Dünnschicht-chromatographie	
	pH 6,4	pH 3,5	Lsgm. D ^a	Lsgm. F ^a
	m [$\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$]	m [$\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}$]	R_f	R_f
T_3C_1	$9,0 \cdot 10^{-5}$ An	$3,3 \cdot 10^{-5}$ An	0,36	0,43
N-Acetyl-Ser-Gln-Gly-COOH	$9,0 \cdot 10^{-5}$ An	$3,3 \cdot 10^{-5}$ An	0,36	0,43

^a Zusammensetzung der Lösungsmittelsysteme s. Tab. 28, S. 104. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 102 ff.

7. Identifizierung der Akzeptorgruppe und Teilstruktur für das Enzym

a) O $\rightarrow$ N-Acetylumlagerung

Im Hinblick auf die Spezifität des Trypsins (vgl. S. 30) mußte das Peptid T_3 nach seiner Freisetzung aus dem Enzymprotein ursprünglich eine freie Aminoendgruppe besessen haben. Diese konnte erst in einer Folgereaktion blockiert worden sein. Welche Reaktion vor sich gegangen war, wurde klar, nachdem wir nachgewiesen hatten, daß die Blockierung des Aminoendes durch den [^{14}C]Acetylrest verursacht wurde: Der [^{14}C]Acetylrest war im denaturierten [^{14}C]Acetyl-Enzym in Esterbindung am Seitenkettensauerstoff des Serinrestes fixiert gewesen. Nach dem Freiwerden der Aminogruppe des Serins im Zuge der tryptischen Verdauung war er jedoch vom Sauerstoff auf das benachbarte Stickstoffatom gewandert, unter Ausbildung der unter den Reaktionsbedingungen stabilen Amidbindung (Abb. 54).

Es ist von Serin bekannt, daß an ihm, begünstigt durch die Nachbarschaft von Hydroxy- und Aminogruppe, reversible Acylverschiebungen stattfinden können (Lit. 32, 77). Die Richtung der Wanderung des Acylrestes hängt vom pH-Wert des Mediums ab. Während in stark saurer Lösung die Bildung der O-Acylverbindung bevorzugt ist, liegt das Gleichgewicht der Reaktion im neutralen und basischen Gebiet ganz auf der Seite des N-Acyl-derivates der Aminosäure. Nach der übereinstimmenden Ansicht verschiedener Autoren, die die Umlagerung vor allem am Grundgerüst des Serins, dem Äthanolamin, studierten,

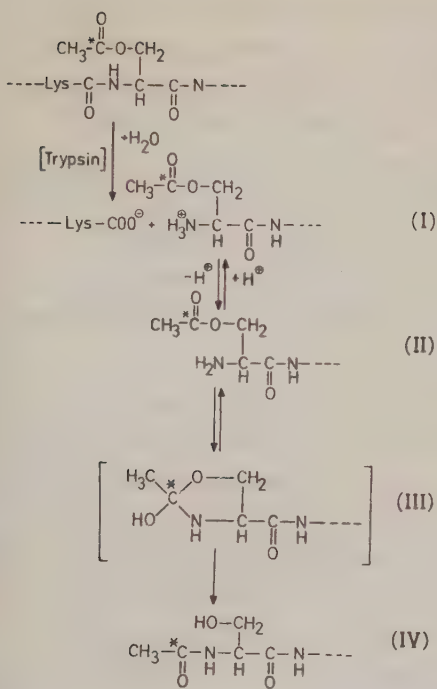


Abb. 54. Mechanismus der O → N-¹⁴C-Acetylverschiebung am N-terminalen Serinrest (I) des Peptids T₃.

kommt es bei der O → N-Acylverschiebung intermediär zur Ausbildung eines Oxazolidin-Ringes [Abb. 54, (III)] (Lit. 78-80). Die Öffnung dieses Ringes zur N-Acetylverbindung [Abb. 54 (IV)] stellt wahrscheinlich unter den von uns bei der tryptischen Spaltung eingehaltenen Reaktionsbedingungen (vgl. S. 49) den langsamsten und damit geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion dar (Lit. 80).

Um einen Eindruck von der Größe der Umlagerungsgeschwindigkeit zu bekommen, inkubierten wir eine wässrige Lösung von O-[¹⁴C]Acetyl-serin (0,013 M) im Autotitratator bei pH 6,9-7,0 und einer Temperatur von 37°C. Der Ablauf der Reaktion ließ sich am Verbrauch von Natronlauge verfolgen. Eine papierelektrophoretische Untersuchung (pH 3,5) des Reaktionsgemisches nach einer Inkubationszeit von 7,5 Stunden zeigte, daß zu diesem Zeitpunkt 90% des O-[¹⁴C]Acetylserins in die N-[¹⁴C]Acetylverbindung um-

gewandelt worden waren. Auf Grund dieses Resultats konnte vermutet werden, daß die Gesamtmenge der O-[¹⁴C]Acetylform des Peptids T₃ während der Verdauungsprozeduren (vgl. S. 49-52) in die N-[¹⁴C]Acetylform umgewandelt worden war (vgl. dazu auch S. 78).

b) Kinetische Analyse

Mit den oben genannten Befunden war es schon sehr wahrscheinlich, daß der gesuchte Acetylakzeptor mit der Hydroxylgruppe eines Serinrestes identisch war. Die folgenden Experimente lieferten weitere Beweise für die Richtigkeit dieser Annahme.

Angeregt durch Untersuchungen von Jencks (Lit. 81) am Acetyl-Chymotrypsin bestimmten wir in einer Versuchsreihe die Geschwindigkeiten, mit denen die [¹⁴C]Acetylreste unter dem Einfluß von Alkali aus denaturierter [¹⁴C]Acetyl-Y-Synthetase und aus einem

synthetischen O- ^{14}C Acetyl-seryl-Peptid freigesetzt wurden. Beide Verbindungen sollten in ihrer Reaktivität bei der alkalischen Hydrolyse übereinstimmen, wenn die ^{14}C Acetylreste, wie erwartet, im denaturierten Enzym in Esterbindung an einem Serinrest fixiert waren (Lit. 81). Zur Spaltung kam hierbei ein mit Harnstoff ausgefälltes ^{14}C Acetyl-Enzym, dessen thioesterartig gebundene ^{14}C Acetylreste durch Behandlung mit Perameisensäure entfernt worden waren (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 109). Als Vergleichssubstanz benutzten wir Pyrrolidonyl-(O- ^{14}C acetyl)seryl-glycin (vgl. S. 107). Da vermutet wurde, daß in den peptischen ^{14}C Acetyl-Peptiden P_1 , P_4 und P_9 die radioaktive Essigsäure noch in derselben Bindung vorlag wie im denaturierten Enzym, wurden sie in die Untersuchung einbezogen.

Die Verseifung der einzelnen Verbindungen wurde in Gegenwart eines großen Baseüberschusses ausgeführt, so daß sich ein Geschwindigkeitsverlauf von formal I. Ordnung (pseudomonomolekulare Reaktion) ergab. Der Fortschritt der Hydrolyse ließ sich leicht und scharf verfolgen, indem zu verschiedenen Zeiten ein Aliquot der Reaktionsgemische mit Ameisensäure angesäuert und der nichtflüchtige Teil der Radioaktivität bestimmt wurde (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 109). Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die an den jeweiligen Zeitpunkten vorliegenden Restkonzentrationen der Ausgangsstoffe halblogarithmisch über der Inkubationszeit aufgetragen und die Konstanten aus der Halbwertszeit τ_1 nach der Gleichung $k_1 = \ln 2/\tau_1$ errechnet. Die Abb. 55-58 zeigen die Ergebnisse unserer Messungen.

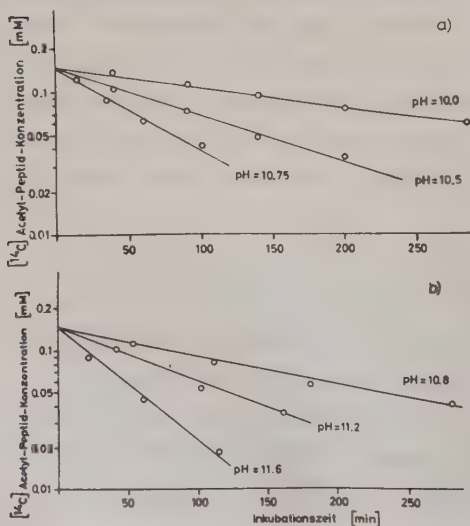


Abb. 55.

Zeitlicher Verlauf der Abspaltung von ^{14}C Essigsäure aus Pyrrolidonyl-(O- ^{14}C acetyl)seryl-glycin bei verschiedenen pH-Werten (25°C).

Abb. 55 a. Verseifung in Abwesenheit von Harnstoff.
Abb. 55 b. Verseifung in Gegenwart von 8M Harnstoff.
Einzelheiten vgl. Exp. Teil, S. 109.

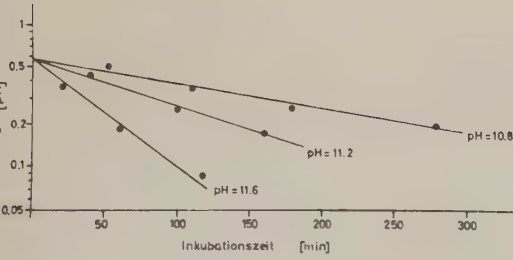


Abb. 56.

Zeitlicher Verlauf der Abspaltung von $[^{14}\text{C}]$ Essigsäure aus $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase in 8 M Harnstoff bei verschiedenen pH-Werten (25°C).

c = Konzentration der proteingebundenen $[^{14}\text{C}]$ Acetylreste.

Einzelheiten s. Exp. Teil, S. 109.

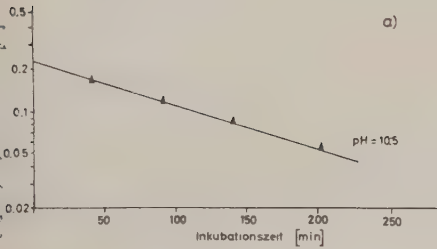


Abb. 57.

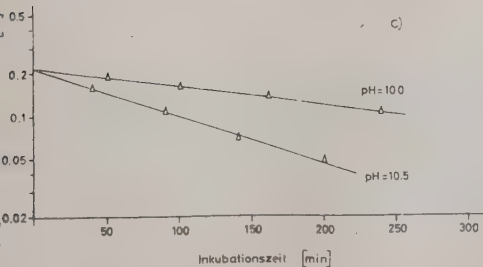
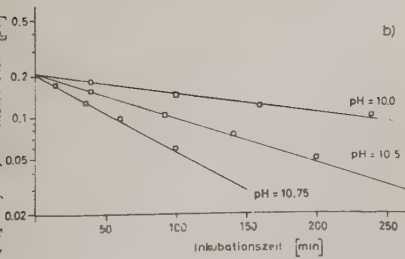
Zeitlicher Verlauf der Abspaltung von $[^{14}\text{C}]$ Essigsäure aus den $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptiden P_1 , P_4 und P_9 bei verschiedenen pH-Werten (25°C).

Abb. 57a. Verseifung von P_1 .

Abb. 57b. Verseifung von P_4 .

Abb. 57c. Verseifung von P_9 .

Einzelheiten s. Exp. Teil, S. 109.



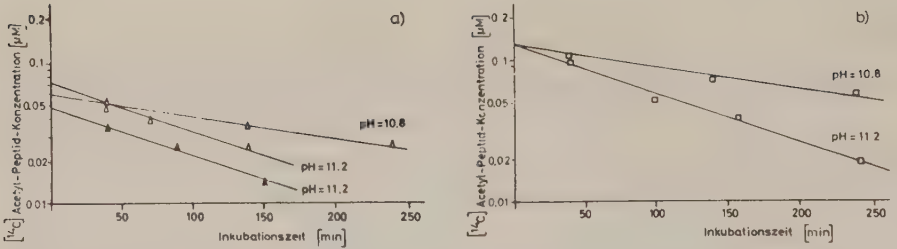


Abb. 58. Zeitlicher Verlauf der Abspaltung von $[^{14}\text{C}]$ Essigsäure aus den $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptiden P_1 , P_4 und P_9 in 8 M Harnstoff bei verschiedenen pH Werten (25°C).

Abb. 58 a. ($\blacktriangle$ - $\blacktriangle$) Verseifung von P_1 ; ($\triangle$ - $\triangle$) Verseifung von P_9 .

Abb. 58 b. Verseifung von P_4 .

Einzelheiten vgl. Exp. Teil, S. 109.

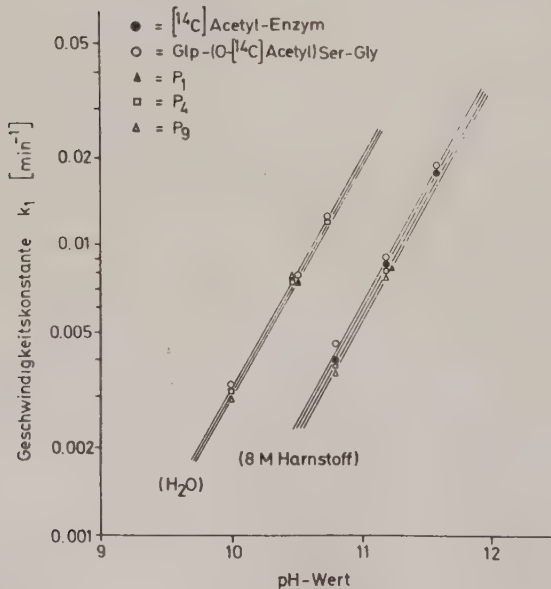


Abb. 59. pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Abspaltung von $[^{14}\text{C}]$ Essigsäure aus Pyrrolidonyl-(O- $[^{14}\text{C}]$ acetyl)seryl-glycin, denaturiertem $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzym und den $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptiden P_1 , P_4 und P_9 (Auswertung der Meßdaten von Abb. 55-58).

In Abb. 59, sind die aus den Umsatz-Zeit-Kurven der Abb. 55-58 ermittelten Geschwindigkeitskonstanten über den zugehörigen pH-Werten aufgetragen. Der Abb. kann entnommen werden, daß bei einem bestimmten pH-Wert die Modellverbindung und alle peptischen Peptide in Wasser mit derselben Geschwindigkeit verseift wurden. Niedriger, jedoch ebenfalls identisch waren die Hydrolysegeschwindigkeiten dieser Substanzen in 8 M Harnstoff; sie deckten sich vollkommen mit der Verseifungsgeschwindigkeit des [^{14}C]Acetyl-Enzyms. Die kinetischen Daten ließen sich nur so interpretieren, daß sowohl im denaturierten [^{14}C]Acetyl-Enzym als auch in den peptischen [^{14}C]Acetyl-Peptiden die Essigsäure in Esterbindung an einem Serinrest gebunden war [vgl. dazu auch (Lit. 81)].

c) Teilstruktur für das Enzym

Die Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung des mengenmäßig bedeutendsten peptischen [^{14}C]Acetyl-Peptids P_1 hatte ergeben, daß es Serin und Lysin enthielt (vgl. S. 40). Am Serin war, wie die Resultate der oben geschilderten Versuche zeigten, die radioaktive Essigsäure fixiert. Vom Lysin konnte angenommen werden, daß es mit diesem Serin verknüpft war. Die Schlußfolgerung gründete sich auf den Befund, daß der Acetylrest im tryptischen [^{14}C]Acetyl-Peptid T_3 an einem aminoendständigen Serin gebunden war (vgl. S. 71). Im Hinblick auf die Spezifität des Trypsins (vgl. S. 30) mußte der die Essigsäure tragende Serinrest von T_3 im Acetyl-Enzym entweder mit Lysin oder Arginin verbunden gewesen sein. Wenn man nun von der naheliegenden Annahme ausging, daß das peptische Peptid P_1 und das tryptische Peptid T_3 aus demselben Bereich des Acetyl-Enzyms stammten, so konnte im Enzym und im peptischen Peptid mit einer Bindung des Serins an Lysin gerechnet werden, da das peptische Peptid Lysin, jedoch kein Arginin enthielt. Daraus ergab sich eine interessante Folgerung: Es sollte möglich sein, das peptische Peptid P_1 durch Behandlung mit Trypsin in zwei Bruchstücke zu zerlegen. Von einem dieser Spaltstücke konnte erwartet werden, daß es an seinem Aminoende einen Serinrest besaß, der die radioaktive Essigsäure zunächst am Sauerstoff, dann jedoch, nach der unter den Reaktionsbedingungen eintretenden $\text{O} \rightarrow \text{N}$ -Verschiebung des [^{14}C]Acetylrestes, am Stickstoff gebunden trug. Die Bindung der Essigsäure an die endständige Aminogruppe im Umlagerungsprodukt sollte sich durch eine Erhöhung ihrer Resistenz gegenüber Verseifung bemerkbar machen. Das nachstehend beschriebene Experiment bestätigte unsere Vermutung.

Das Peptid P_1 (14 nMol) wurde bei pH 6,9-7,0 mit 10% Trypsin inkubiert (nähere Angaben vgl. S. 110). Nach 14 Stunden bei 37°C lieferte die Gelfiltration des Reaktionsgemisches (Abb. 60) zwei radioaktive Fraktionen, die 73% (P_1) bzw. 13% (P_1T_1) der Radioaktivität des zur Spaltung eingesetzten [^{14}C]Acetyl-Peptids auf sich vereinigten. Der große Gipfel rührte von unverdaut gebliebenem Peptid P_1 her, der kleinere hingegen stellte ein tryptisches Abbauprodukt des Peptids dar. Wir untersuchten die Reaktivität

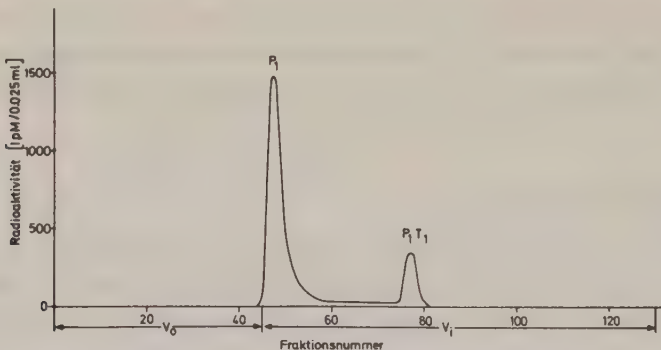


Abb. 60. Gelfiltration des tryptischen Hydrolysats von [^{14}C]Acetyl-Peptid P_1 an Sephadex G10.

Säule: 1,1·105 cm; Probevolumen: 0,5 ml; Eluant: 5proz. Essigsäure; Durchfluß: 7 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,8 ml.

der in diesem Spaltstück gebundenen radioaktiven Essigsäure und stellten fest, daß sich unsere Erwartungen erfüllt hatten (Abb. 61). Der [^{14}C]Acetylrest war aus der leicht hydrolysierbaren Esterbindung, in der er im Peptid P_1 vorgelegen hatte (vgl. Abb. 57 a, S. 75), in eine schwerer spaltbare Amidbindung, wie sie auch im Peptid T_3 bestand, übergegangen.

Bei der Gelfiltration fiel es uns auf, daß die Substanz P_1T_1 mit etwa der gleichen Verzögerung eluiert wurde wie das Abbauprodukt T_3C_1 des tryptischen [^{14}C]Acetyl-Peptids T_3 im Versuch von Abb. 48, S. 65. Es lag daher nahe, zu prüfen, ob beide Verbindungen identisch waren. Tab. 22 zeigt, daß die Peptide in ihren elektrophoretischen Mobilitäten bei pH 6,4 und 3,5 und in ihren R_f -Werten bei der Dünnschichtchromatographie mit zwei verschiedenen Laufmitteln genau übereinstimmten. Gleichheit bestand ferner im Verhalten bei der alkalischen Hydrolyse (Abb. 61).

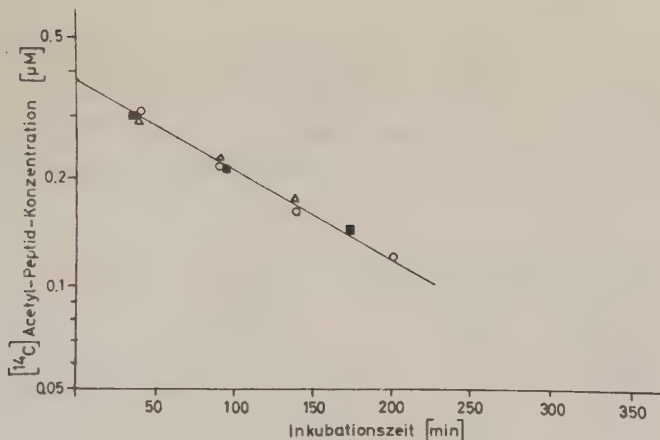


Abb. 61. Zeitlicher Verlauf der Abspaltung von [¹⁴C] Essigsäure aus den [¹⁴C] Acetyl-
-Peptiden P₁T₁, T₃ und T₃C₁ durch 1 N NaOH bei 60°C.

(Δ), Verseifung von P₁T₁; (■), Verseifung von T₃C₁; (○), Verseifung von T₃.
Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 109.

Tabelle 22. Papierelektrophoretischer und dünnschichtchromatographischer Vergleich
von [¹⁴C] Acetyl-Peptid P₁T₁ mit [¹⁴C] Acetyl-Peptid T₃C₁.

Verbindung	Papierelektrophorese		Dünnschicht- chromatographie	
	pH 6,4	pH 3,5	Lsgm. D ^a	Lsgm. F ^a
	m [cm ² /V · sec]	m [cm ² /V · sec]	R _f	R _f
P ₁ T ₁ (Abb. 60)	8,2 · 10 ⁻⁵ An	3,6 · 10 ⁻⁵ An	0,33	0,40
P ₁ T ₁ (Abb. 62)	8,2 · 10 ⁻⁵ An	3,6 · 10 ⁻⁵ An	0,33	0,40
T ₃ C ₁	8,2 · 10 ⁻⁵ An	3,6 · 10 ⁻⁵ An	0,33	0,40

^a Zusammensetzung der Lösungsmittelsysteme s. Tab. 28, S. 104. Experimentelle Einzelheiten s. S. 102 ff.

Um noch einen weiteren Beweis für die Identität beider Peptide zu erhalten, untersuchten wir die Aminosäurezusammensetzung von P₁T₁. Die beim ersten Spaltversuch erhaltene Substanzmenge reichte allerdings für eine Aminosäureanalyse nicht aus. Wir unterzogen deshalb den unverdaut gebliebenen Teil von P₁ einer erneuten Behandlung mit 10% Trypsin. Die Verdauung nahmen wir, im Interesse einer hohen Ausbeute an Spaltprodukt, abweichend von der bisherigen Versuchsdurchführung in schwach alkali-

schem Gebiet (pH 7,5) vor (experimentelle Einzelheiten vgl. S. 110). Der Verlust an peptidgebundenen [^{14}C]Acetylresten belief sich dabei - nach einer 10stündigen Inkubation bei 37°C - auf 5%. Wie das Elutionsdiagramm der Gelfiltration des Spaltansatzes erkennen ließ (Abb. 62), war es unter den veränderten Reaktionsbedingungen gelungen,

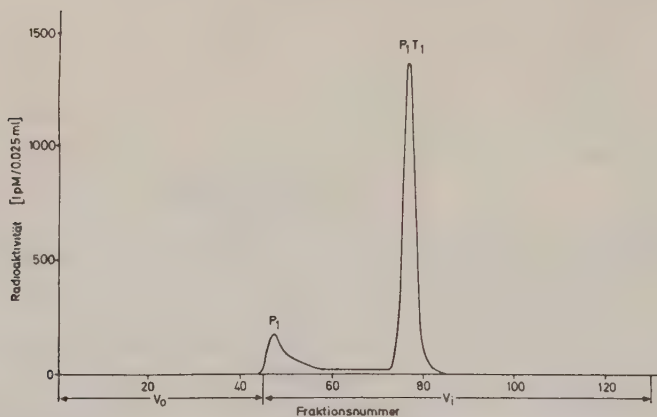


Abb. 62. Sephadex-G10-Filtration des tryptischen Hydrolysats von [^{14}C]Acetyl-Peptid P_1 (nach Durchführung der Verdauung bei pH 7,5). Gelfiltration wie bei Abb. 60.

den größten Teil des Peptids P_1 in das Peptid P_1T_1 umzuwandeln: Der große Gipfel, der 73% der zur Spaltung eingesetzten Radioaktivität enthielt, erschien im Eluat in derselben Position wie der kleine Gipfel im Versuch von Abb. 60, S. 78. Beide Fraktionen verhielten sich in der Papierelektrophorese und in der Dünnschichtchromatographie identisch (Tab. 22, S. 79). Ihre Aminosäureanalyse lieferte die in Tab. 23 wiedergegebenen Resultate. Diese zeigten, daß das Peptid P_1T_1 noch mit Spaltprodukten verunreinigt war, die beim Zerfall des Trypsins entstanden waren. Ersichtlich waren jedoch die Aminosäuren Serin und Glutaminsäure in der erwarteten Menge vorhanden. Glycin lag noch in größerer Menge vor.

Mit den geschilderten Ergebnissen sahen wir es als ausreichend gesichert an, daß die Peptide P_1T_1 und T_3C_1 identisch waren.

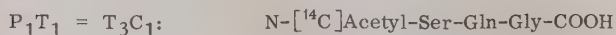


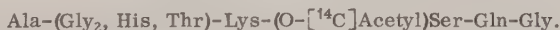
Tabelle 23. Aminosäureanalyse des
[¹⁴C]Acetyl-Peptids P₁T₁.

Aminosäure	Aminosäurereste/Molekül [¹⁴ C]Acetyl-Peptid
Lys	0.46
His	0.50
Arg	-
Asp	0.39
Thr	0.37 ^a
Ser	1.22 ^a (1)
Glu	0.95 (1)
Pro	-
Gly	1.86 (1)
Ala	0.54
Cys	nicht bestimmt
Val	-
Met	-
Ile	0.17
Leu	0.18
Tyr	-
Phe	-
Trp	nicht bestimmt
β-Ala	nicht bestimmt

^a Werte wurden nicht korrigiert.
Die angenommene Anzahl der Aminosäurereste ist in Klammern gesetzt. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 104.

Der Befund ließ die folgenden Schlüsse zu:

1. Das peptische [¹⁴C]Acetyl-Peptid P₁ besaß die Teilstruktur



Dies ergab sich aus dem Aufbau seines tryptischen Spaltprodukts P₁T₁.

2. Das peptische [¹⁴C]Acetyl-Peptid P₁ und das tryptische [¹⁴C]Acetyl-Peptid T₃ stammten aus demselben Bereich des [¹⁴C]Acetyl-Enzyms. Für diesen Tatbestand sprach die beobachtete Identität ihrer auf verschiedenen Wegen erhaltenen Abbauprodukte.

Aus der Überlappung des Carboxylendes des peptischen Peptids mit dem Aminoende des tryptischen Peptids folgte die in Abb. 63, S. 82 wiedergegebene Teilstruktur für das [¹⁴C]Acetyl-Enzym, die das Carboxylende einer Polypeptidkette des Enzyms darstellt. Die Abbaureaktionen, die zur Aufklärung der Struktur durchgeführt wurden, sind im unteren Teil der Abb. zusammengefaßt.

Schweizer (Lit. 18, 22) (vgl. auch S. 4) isolierte aus Fettsäuresynthetase, die mit radioaktiver Malonsäure beladen war, nach peptischer Spaltung zwei peroxydations-

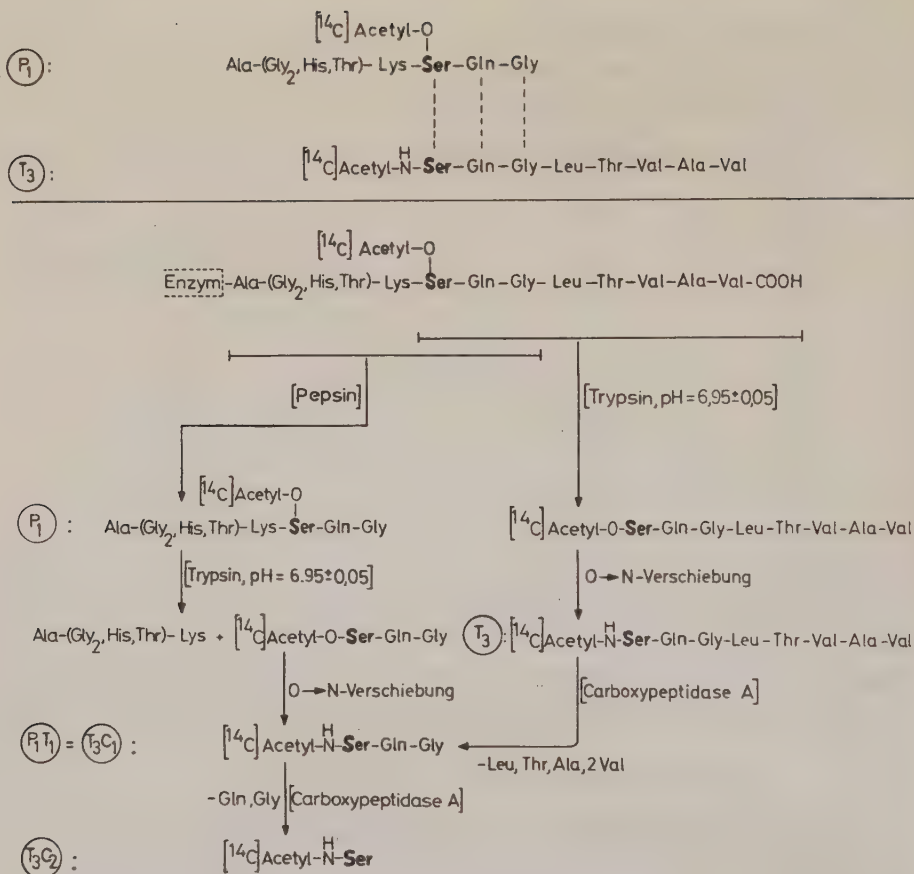


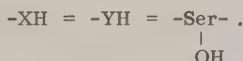
Abb. 63. Teilstruktur für das $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzym und Abbaureaktionen.

stabile $[^{14}\text{C}]$ Malonyl-X-Peptide der in Abb. 64 wiedergegebenen Aminosäurezusammensetzung. Die Sequenz der Verbindungen ist noch unbekannt. Aus einem Vergleich ihrer Aminosäurezusammensetzung mit der Partialformel des $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms geht jedoch bereits hervor, daß sie nicht Bestandteile des letzteren sein können. Lediglich die chemische Natur der Acylakzeptoren dürfte in beiden Fällen dieselbe sein; denn verschiedene Indizien ließen vermuten (Lit. 22), daß auch in den Malonyl-Peptiden die Acylgruppen an einem Serinrest in Esterbindung fixiert waren.

Malonyl - -Transferase	$[^{14}\text{C}]$ Malonyl-X-(Ser, His, Gly, Ala) -Leu-COOH $[^{14}\text{C}]$ Malonyl-X-(Ser, His, Gly ₂ , Ala, Glu, Leu)	(E. Schweizer u. F. Lynen; 1965)
Acetyl - -Transferase	$[^{14}\text{C}]$ Acetyl-O Enzym-Ala-(Gly ₂ , His, Thr)-Lys-Ser-Gln-Gly-Leu-Thr-Val-Ala-Val-COOH	

Abb. 64. Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von $[^{14}\text{C}]$ Malonyl-X-Peptiden mit der Partialformel des $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms.

Unter der Voraussetzung, daß die Malonyl- und Acetyl-Spaltpeptide tatsächlich aus den aktiven Zentren der Acylgruppen-übertragenden Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase stammen, was als sehr wahrscheinlich angesehen wird (vgl. S. 87), war aus ihrer fehlenden Übereinstimmung zu schließen, daß Malonyl- und Acetyl-Übertragungsreaktion nicht von ein und derselben, sondern von zwei verschiedenen Komponenten des Enzymkomplexes katalysiert werden. In beiden Enzymen werden die Transferreaktionen jedoch über Hydroxylgruppen von Serinresten abgewickelt, d.h. es ist



8. Untersuchungen zur Struktur des tryptischen $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptids T₄

Der Anteil des Peptids T₄ an der Gesamtmenge der tryptischen $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide betrug 19% (vgl. Abb. 44, S. 57). Wie Peptid T₃ enthielt es die radioaktive Essigsäure in peroxydationsstabiler Bindung (vgl. Tab. 14, S. 57). Es lag nach dem in Kap. B, III, 5 beschriebenen Trennungsgang in einer Endausbeute von 127 nMol vor. Die Konstitutionsermittlung des Peptids war bei Abschluß der vorliegenden Arbeit noch nicht beendet. In diesem Kapitel soll ein Überblick über die bisher bekannten Eigenschaften der Verbindung gegeben werden.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Peptids auf dem Wege über die Totalhydrolyse nach (Lit. 53) und anschließende Aminosäureanalyse bereitete Schwierigkeiten. Die Ursache hierfür war in einer in der Peptidlösung enthaltenden Verunreinigung zu sehen, welche die vorhandenen Aminosäuren während der Säurespaltung des Peptids oxydativ abbaute. Wir beobachteten daher für einige der Aminosäuren Analysenwerte, die niedriger waren, als auf Grund der eingesetzten Menge an $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptid zu

Tabelle 24. Aminosäureanalyse des [^{14}C]Acetyl-Peptids T₄.

Amino- säure	Säurehydrolyse						Enzymatische Hydrolyse	
	ohne Thioglykol- säure-Zusatz			mit Thioglykol- säure-Zusatz ^a			1,5 h CPA ^b	3 h CPA ^b
	Aminosäurereste/Molekül [¹⁴ C]Acetyl-Peptid							
Lys	-	-	-	-	-	-	-	-
His	-	-	-	-	-	-	-	-
Arg	-	-	-	-	-	-	-	-
Asp	-	-	-	-	-	-	-	-
Thr	-	-	-	0,88 ^c (1)	0,86 ^c (1)	0,94 (1)	1,12 (1)	
Ser	-	-	-	0,89 ^c (1)	0,94 ^c (1)	-	-	
Glu	0,45	0,74	0,51	1,96 (2)	2,07 (2)	-	-	
Gln	-	-	-	-	-	0,38	0,51	
Pro	-	-	-	-	-	-	-	
Gly	0,29	0,39	0,36	0,97 (1)	1,07 (1)	0,12	0,31	
Ala	0,74	0,87	0,79	0,88 (1)	0,84 (1)	0,96 (1)	1,01 (1)	
Cys	-	-	-	-	-	-	-	
Val	0,36	0,79	0,51	1,02 (1)	1,11 (1)	1,02 (1)	0,95 (1)	
Met	-	-	-	-	-	-	-	
Ile	-	-	-	-	-	-	-	
Leu	0,66	0,62	0,58	1,68 (2)	1,75 (2)	1,83 (2)	1,99 (2)	
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	
Phe	-	-	-	-	-	-	-	
Trp ^d	-	-	-	-	-	-	-	
β-Ala	-	-	-	-	-	-	-	

^a Einzelheiten vgl. S. 104, 105.

^b Die Werte wurden nach 1,5 bzw. 3stündiger Behandlung des Peptids mit 5% Carboxypeptidase A bei 37°C erhalten. Einzelheiten vgl. S. 106.

^c Werte wurden nicht korrigiert.

^d Tryptophanbestimmung mit Ehrlich's Reagenz (Lit. 45) und nach (Lit. 61).
Die angenommene Anzahl der Aminosäurereste ist in Klammern gesetzt.

erwarten war (Tab. 24). Diese Werte waren überdies von Hydrolyse zu Hydrolyse Schwankungen unterworfen. Andere Aminosäuren konnten zunächst überhaupt nicht nachgewiesen werden. Zuverlässig erscheinende, reproduzierbare Meßergebnisse erhielten wir erst, als wir die salzsaure Hydrolyse des Peptids in Gegenwart eines Antioxydationsmittels durchführten. Als oxydationshemmender Zusatz bewährte sich Thioglykolsäure. Die in Tab. 24 wiedergegebenen Resultate sprachen dafür, daß es sich bei T₄ um ein [^{14}C]Acetyl-Nonapeptid der Zusammensetzung

[^{14}C]Acetyl-(Thr, Ser, Glx₂, Gly, Ala, Val, Leu₂)

handelte. Durch enzymatische Hydrolyse mit Carboxypeptidase A ließ sich zeigen, daß das Peptid Glutamin enthielt (Tab. 24). Auffallend war, daß keine basischen Aminosäuren nachgewiesen werden konnten. T₄ sollte jedoch als tryptisches Peptid Arginin oder Lysin als C-Terminale besitzen, es sei denn, es stammte von einem Carboxylende des [¹⁴C]Acetyl-Enzyms (vgl. S. 58). Wie in Kap. B, III, 6a gezeigt wurde, war die Entstehung des Peptids nicht auf die Wirkung einer chymotryptischen Verunreinigung in dem zur Spaltung des radioaktiven Acetyl-Enzyms benutzten Trypsin zurückzuführen. Ein zusätzlicher Hinweis auf die Abwesenheit von Arginin im vorliegenden Peptid konnte in dessen leichter Hydrolysierbarkeit durch Carboxypeptidase A gesehen werden. Es ist von diesem Enzym bekannt, daß es Arginin nicht abzuspalten vermag (Lit. 72). Ein Abbau wäre somit bei Anwesenheit eines Argininrestes am Carboxylende des Peptids nicht möglich gewesen.

Weitere Untersuchungen galten der Struktur des Aminoendes des Peptids und der Bindungsstelle der radioaktiven Essigsäure.

Aus der Beobachtung, daß sich das Peptid nicht nach Edman abbauen ließ (Tab. 25), war zu schließen, daß es keine freie Aminoendgruppe enthielt. Worauf dies zurückzuführen war, wurde noch nicht näher untersucht. Beim Studium der alkalischen Hydrolyse des Peptids ergab sich allerdings ein Anzeichen dafür, daß an der endständigen Amino- gruppe möglicherweise der [¹⁴C]Acetylrest fixiert war. Wie sich aus Abb. 65, S. 86 entnehmen läßt, zeigte das Peptid T₄ eine größere Resistenz gegenüber der Einwirkung

Tabelle 25. Versagen des Edman-Abbaus für Peptid T₄.

Amino- säure	Aminosäure- zusammensetzung		Edman-Abbau 1.Stufe	
	Aminosäurereste/Molekül [¹⁴ C]Acetyl-Peptid			
Thr	0,87	(1)	0,98	(1)
Ser	0,92	(1)	1,01	(1)
Glx	2,02	(2)	2,10	(2)
Gly	1,02	(1)	1,09	(1)
Ala	0,86	(1)	0,99	(1)
Val	1,07	(1)	1,10	(1)
Leu	1,72	(2)	1,65	(2)

Die in Klammern stehenden Werte geben die angenommene Zahl der Aminosäurereste wieder. Experimentelle Einzelheiten vgl. S. 106.

von Natronlauge als das N- ^{14}C -Acetyl-seryl-Peptid T_3 . Daraus konnte gefolgert werden, daß der radioaktive Acetylrest in T_4 wahrscheinlich ebenfalls in einer schwer verseifbaren Amidbindung vorlag. Die größere Stabilität dieser Bindung deutete freilich darauf hin, daß die Bindungsverhältnisse im Detail nicht mit denen von T_3 übereinstimmten. Im Hinblick auf seine bisher bekannte Zusammensetzung konnte das Peptid T_4 nur am N-Terminus eine als Acetylakzeptor geeignete NH_2 -Gruppe besessen haben. Es lag daher die Vermutung nahe, daß diese auf noch ungeklärte Weise den ^{14}C -Essigsäurerest aufgenommen hatte.

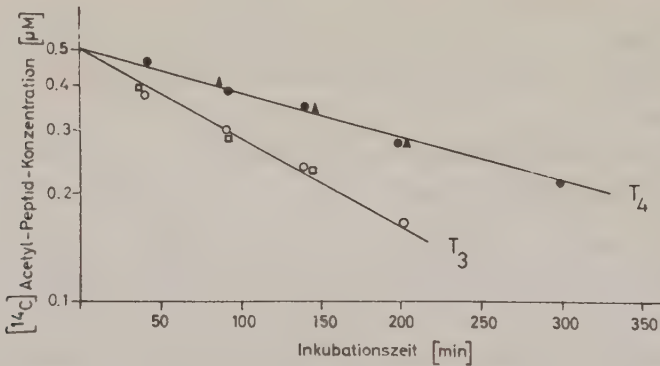


Abb. 65. Zeitlicher Verlauf der Abspaltung von ^{14}C -Essigsäure aus den ^{14}C -Acetyl-Peptiden T_3 und T_4 durch 1 N NaOH bei 60°C .

(○), Verseifung von T_3 ; (●), Verseifung von T_4 ; (□), Verseifung von $T_I = T_3$; (▲), Verseifung von $T_{II} = T_4$ (T_I und T_{II} wurden durch Spaltung des ^{14}C -Acetyl-Enzyms mit einem DCC-behandelten Trypsin erhalten, vgl. S. 59). Einzelheiten vgl. Exp. Teil, S. 109.

Ausführliche Untersuchungen zur Sequenz des Peptids liegen noch nicht vor. Bisher sind lediglich die Positionen von Glutamin und Glycin bekannt. Sie können aus den in Tab. 24, S. 84 wiedergegebenen Resultaten des CPA-Abbaus abgeleitet werden: Da Glutamin erst nach der Freisetzung der Aminosäuren Threonin, Alanin, Valin und Leucin (2) von Carboxypeptidase A abgespalten wurde, dürfte es in der Sequenz auf diese Aminosäuren folgen. Mit Glutamin ist Glycin verknüpft. Dies folgt aus der Beobachtung, daß Glycin erst im Anschluß an Glutamin freigesetzt wurde.

Die in den vorangehenden Abschnitten geschilderten Resultate sind in der Teilformel



für das Peptid T₄ zusammengefaßt.

Die vollständige Sequenz des Peptids sowie seine Entstehungsgeschichte müssen erst die weiteren Untersuchungen klären. Dabei muß auch der Frage Beachtung geschenkt werden, ob bereits alle Bestandteile der Verbindung identifiziert worden sind. Aus einem Vergleich der bisher bekannten Strukturmerkmale von T₄ mit der Konstitution von T₃ geht hervor, daß die Peptide nicht aus dem gleichen Bereich einer Polypeptidkette des Enzyms stammen.

9. Diskussion

Die in den Kap. B III, 1. - 3. und 5. - 7. beschriebenen Untersuchungen hatten den Nachweis erbracht, daß der Essigsäurerest im Beladungsversuch bevorzugt von der Hydroxylgruppe eines Serinrestes des Enzyms aufgenommen wurde. Es stellte sich die Frage, ob diese Gruppe mit der im aktiven Zentrum der Acetyl-Transferase lokalisierten Wirkgruppe "-YH" identisch ist, die im Sinne von Gl. (19) und Gl. (20), S. 26, den Acetylrest vom Thioester Acetyl-CoA unter intermediärer Ausbildung einer Esterbindung auf die Sulfhydrylgruppe des 4'-Phosphopantetheins der ACP-Komponente überträgt.

Serin kommt in den aktiven Zentren zahlreicher acylgruppen-übertragender Enzyme vor, wobei es, wie man in einigen Fällen sicher nachgewiesen hat, die nukleophile Wirkstelle der Enzyme darstellt, über deren Acylierung und Deacylierung die Transferreaktionen ablaufen (Lit. 32-34, 82-84). Serin scheint mithin bei entsprechender Aktivierung durch benachbarte, von der Tertiärstruktur der Enzyme in günstigen Positionen gehaltene Aminosäuren als Wirkgruppe für die Übertragung von Acylresten besonders geeignet zu sein. Wir haben Grund zu der Annahme, daß auch der aus der Fettsäuresynthetase isolierte, essigsäure-bindende Serinrest mit seiner Hydroxylgruppe im Enzym die Funktion des Acetylgruppenüberträgers ausübt.

Ein starkes Indiz für seine Herkunft aus einem aktiven Zentrum sehen wir in der Tatsache, daß er als einziger von 252-630 Serinresten einer funktionellen Einheit der Fettsäuresynthetase ^{*)} mit Acetyl-CoA reagiert und das in großem Ausmaße. Er ist somit

^{*)} Der Fettsäuresynthetase-Gesamtkomplex enthält 1260 Serinreste (Lit. 29), die sich auf ca. 2-5 funktionelle Grundeinheiten verteilen (Lit. 27, 14, 23, 85).

vor allen anderen Serinresten des Enzymkomplexes durch eine hohe Reaktivität ausgezeichnet, wie sie nur mit einer Stellung in einem aktiven Zentrum zu erklären ist. Daß dieses Zentrum mit demjenigen der Acetyl-Transferase identisch ist, lassen die schon früher (S. 4) erwähnten Befunde von Schweizer (Lit. 19, 22) vermuten. Nach Zusatz von NADPH und Malonyl-CoA zu aktiver [^{14}C]Acetyl-Fettsäuresynthetase, welche die Acetylreste etwa zur Hälfte in peroxydationsstabiler Bindung enthielt, wurde ein 95proz. Einbau der radioaktiven Essigsäure in die synthetisierten Fettsäuren beobachtet.

Für einen Teil der bekannten, einen Serinrest im aktiven Zentrum enthaltenden Enzyme ("Serin-Enzyme") ist es charakteristisch, daß sie sich durch Organofluorophosphate hemmen lassen (Lit. 32, 82). Die Inhibitorwirkung dieser Substanzen beruht auf der Phosphorylierung der für die enzymatische Aktivität essentiellen Serinhydroxylgruppen (Lit. 32). Anzeichen für eine Hemmbarkeit der Fettsäuresynthetase durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) ergaben Versuche von Oesterhelt (Lit. 23). Die Inhibierung ließ sich indessen nur in Gegenwart verhältnismäßig hoher Konzentrationen eines DFP-Präparats von nicht genau bekannter Reinheit erzielen (Lit. 86), so daß es noch nicht sicher ist, ob die beobachtete Blockierung der Synthetase tatsächlich der Wirkung von DFP zuzuschreiben ist. Es ist durchaus möglich, daß der Enzymkomplex bzw. seine aktive Serinreste enthaltende Komponenten unempfindlich gegenüber der Einwirkung von Alkylphosphaten sind.

Man weiß, daß die Hemmbarkeit eines Serinrestes durch diese Inhibitoren an ganz bestimmte Aktivierungsverhältnisse geknüpft ist, die bei Serinpeptiden und einer Anzahl von untersuchten "Serin-Enzymen" nicht gegeben sind (Lit. 82).

Auf welche Weise die Aktivierung der essentiellen Serinhydroxylgruppe der Acetyl-Transferase zustande kommt, so daß sie einerseits fähig ist, das Substrat unter Aufnahme des Acetylrestes zu spalten und andererseits den Acetylrest aus der Esterbindung an eine Sulfhydrylgruppe weiterzugeben, ist vorerst noch unbekannt und erfordert die Kenntnis aller übrigen am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren. Es muß der weiteren Untersuchung vorbehalten sein, diese Aminosäuren zu identifizieren.

Aus dem Aufbau des Carboxylendes des tryptischen Peptids T_3 und aus seiner Entstehungsweise hatten wir abgeleitet, daß es das Carboxylende einer Polypeptidkette des Enzyms darstellt. Diese Schlußfolgerung gründete sich auf die heute allgemein als gültig angesehenen Anschauungen über die Spezifität des Trypsins (vgl. S. 30).

Von der Norm abweichende Spaltungen von Peptidbindungen durch Trypsin sind vereinzelt in der Literatur beschrieben (Lit. 39). Sie wurden jedoch nur nach Anwendung energischer Spaltbedingungen beobachtet. Wir sehen in der hohen Ausbeute, in der

das Peptid T₃ nach dem von uns durchgeführten Spaltverfahren erhalten wurde, einen deutlichen Beweis dafür, daß es nicht das Resultat einer unspezifischen, über die Spaltung an den Aminosäuren Arginin und Lysin hinausgehenden Wirkung des Trypsins ist. Für eine verminderte Spezifität des Trypsins außerhalb seines pH-Optimums gibt es gegenwärtig keine Hinweise.

Kürzlich berichtete Porter (Lit. 87), daß auch in der Fettsäuresynthetase aus Taubenleber neben den reaktiven SH-Gruppen Substratbindungsstellen vorhanden sind, die Acetyl- und Malonylreste in peroxydationsstabiler Bindung aufnehmen können. Diese Befunde geben zu der Vermutung Anlaß, daß die am Hefeenzym abgeleiteten Vorstellungen über den Ablauf der Startreaktionen bei der Fettsäuresynthese in den Grundzügen auch für andere Fettsäuresynthetasen zutreffen.

C. Experimenteller Teil

I. Allgemeines

1. Geräte

Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 314 EX, Packard.

Radiopapierchromatograph FH 452 mit Linienschreiber, Friesseke & Hoepfner.

Dünnschicht-Scanner, Modell LB 2722, mit Dual Ratemeter-Integrator,

Modell LB 242 K, Berthold.

Photometer Eppendorf, Netheler & Hinz, mit Kompensograph PR 2210 A/00, Philips.

Spektralphotometer M4 Q II, Zeiss.

Recording Spectrophotometer, Modell 14, Cary.

Kofler-Heizmikroskop, Reichert.

Automatic Superspeed Centrifuge RC-2, Servall.

Präparative Ultrazentrifuge, Modell L, Spinco-Beckman.

Analytische Ultrazentrifuge, Modell E, Spinco-Beckman.

Tischzentrifuge Superspeed Junior 1, Christ.

Fraktionskollektor Radirac, LKB.

pH-Meter, Typ 11/12, Püsl.

Autotitrator, Typ TTT 1b/SBR 2c, Radiometer.

Aminosäureanalysator, Modell 120 B, mit Mikroküvetteneinrichtung, Beckman.

Unichrom Präparativzusatz, Beckman.

Hochspannungsgleichrichter, Hölzel.

Hochspannungselektrophorese-Tank, Modell LT-48 A, Savant.

Hochspannungselektrophorese-Tank, Eigenbau Moosbauer.

Pherograph "Original Frankfurt", Hormuth & Vetter.

Zellhomogenisator, Eigenbau Moosbauer.

Rotavapor "R", Büchi.

2. Materialien

Handelsprodukte waren:

Coenzym A, NADPH, GSH, Carnitin-Acetyltransferase, Citrat-Synthase, Malat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim); Pepsin, Trypsin, Trypsin (DCC-behandelt), Leucinaminopeptidase, Carboxypeptidase A (DFP-behandelt), Dansyl-Aminosäuren, Dowex 50x2, Dowex 2x8 (Serva, Heidelberg); Serumalbumin vom Rind (Behring-Werk, Marburg); Carnitin, Jodacetamid (Schuchardt, München); N-Äthylmaleinimid (Fluka, Buchs); Bis-(3-carboxy-4-nitrophenyl)-disulfid (Fluka und EGA-Chemie, Steinheim); Sephadex G 10, G 15, G 25, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, SE-Sephadex (Pharmacia, Uppsala); Na-[1-¹⁴C]Acetat, [1-¹⁴C]Acetanhydrid, [¹⁴C]Methyljodid (Radiochemical Centre, Amersham); Varsol (Esso, München); Bäckerhefe (Scheibe & Schertel, Oberkotzau); 2,5-Diphenyl-oxazol, 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (Packard, Frankfurt). Alle übrigen Reagenzien waren analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt.

Es wurde nur vollentsalztes Wasser verwendet.

Die folgenden Präparate wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt: S-Acetacetyl-N-acetylcysteamin (Lit. 88), Benzoyl- [¹⁴C]CoA (Lit. 26) (von Oesterheldt); Benzoyl-pantethein (Lit. 89) (von Schultz und Sumper); Palmityl-CoA (Lit. 90) (von Lust); N-Acetylcysteamin (Lit. 91), S-Crotonyl-N-acetylcysteamin (Lit. 28) (von Pirson); S-[2-¹⁴C]Malonyl-N-capryloyl-cysteamin (Lit. 92), [2-¹⁴C]Acetyl-CoA (Lit. 93) (von Willecke); β-Butyrolacton (von Eggerer); Pyrrolidonyl-seryl-glycin (Lit. 75), N-Acetyl-seryl-glutaminy-glycin (Lit. 75) (von Wünsch und Deimer); γ-Dimethylamino-β-hydroxy-buttersäure (Lit. 94) (von Keller). Die Substanzen waren nach der angegebenen Literatur synthetisiert worden.

Acetyl-CoA wurde nach (Lit. 95), [1-¹⁴C]Acetyl-CoA nach (Lit. 7), Malonyl-CoA nach (Lit. 92), S-β-Hydroxybutyryl-N-acetylcysteamin nach (Lit. 88), [¹⁴C]Coenzym A nach (Lit. 26), Pantethein nach (Lit. 27), Acetyl-pantethein nach (Lit. 27), N-Acetyl-Serin nach (Lit. 97), O-Acetyl-serin und O-Acetyl-threonin nach (Lit. 96) dargestellt. O-[¹⁴C]Acetyl-serin wurde in Anlehnung an (Lit. 96) aus Serin und [¹⁴C]Acetanhydrid synthetisiert.

Die Herstellung von [2-¹⁴C]Malonyl-CoA erfolgte nach (Lit. 92). Das Präparat wurde nach (Lit. 27) durch eine bei 4⁰C ausgeführte Papierchromatographie von zwei radioaktiven Verunreinigungen befreit.

Carnitin(methyl-[^{14}C]) wurde nach (Lit. 98) aus γ -Dimethylamino- β -hydroxybuttersäure und [^{14}C]Methyljodid hergestellt und durch Ionenaustauscherchromatographie an Dowex 50x8 (H^+ -Form; Säule: 1.51 cm; Eluant: 1.5 N HCl) gereinigt.

3. Allgemeine analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde i.allg. die Biuretmethode nach Beisenherz et al. (Lit. 99) verwendet [Biuretfaktor 8.6 (Lit. 23)]. Bei sehr geringen Proteingehalten wurde nach der Vorschrift von Murphy und Kies (Lit. 100) gearbeitet.

b) Radioaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Radioaktivität von Lösungen erfolgte im Scintillationsspektrometer. Hierzu wurden Proben der zu vermessenden Lösung auf Papierstreifen (Whatman Nr. 1, 3.7 cm) aufgetragen und diese nach Trocknung mit der Rotlichtlampe oder - beim Vorliegen wärmeempfindlicher Substanzen - mit dem kalten Föhn unter Scintillator-Flüssigkeit in verschiedenen Stellungen ausgezählt. Die Scintillator-Lösung hatte die Zusammensetzung: 5.0 g 2.5-Diphenyl-oxazol + 0.3 g 1.4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol gelöst in 1 l dest. Toluol.

Zur Bestimmung von radioaktiven Substanzen auf Papierchromatogrammen und -phorogrammen sowie auf Dünnschichtchromatogrammen vgl. S. 102 ff.

c) Thioesterbestimmung

Die Bestimmung von Pantethein- und CoA-Derivaten erfolgte durch Messung der Extinktion bei $\lambda = 233 \text{ m}\mu$ (Thioesterbande) (Lit. 101) und mit Hilfe der verzögerten Nitroprussidreaktion (Lit. 102, 92). Für CoA-Verbindungen wurde darüber hinaus die Adenin-Absorption bei $\lambda = 260 \text{ m}\mu$ zur Gehaltsermittlung herangezogen (Lit. 90). S-Crotonyl-N-acetylcysteamin wurde an Hand seiner charakteristischen Absorption bei $\lambda = 263 \text{ m}\mu$ bestimmt (Lit. 28). Acetyl- und Malonyl-CoA wurden enzymatisch bestimmt (Lit. 103, 92).

d) Mercaptanbestimmung

Zum qualitativen Nachweis von Thiolen diente der Na-nitrosylprussiat-Tüpfeltest (Lit. 104). Die quantitative Mercaptanbestimmung wurde nach (Lit. 105) mit Ellman's Reagenz [Bis-(3-carboxy-4-nitrophenyl)-disulfid] durchgeführt. Dazu wurden in eine

Küvette ($d = 1 \text{ cm}$) $70 \mu\text{Mol}$ Tris/HCl-puffer, pH 7,5, $12\text{--}50 \text{ nMol}$ Mercaptan, Wasser ad $1,0 \text{ ml}$ Gesamtvolumen und $0,1 \text{ ml}$ einer frisch bereiteten $0,01 \text{ M}$ Lösung des Natriumsalzes von Ellman's Reagenz gegeben. Die Messung der Extinktion bei $\lambda = 405 \text{ m}\mu$ erfolgte 5 min nach Zusatz des SH-Reagenzes gegen eine Kontrollküvette, die kein Mercaptan, aber die gleichen Zusätze enthielt. Als Eichsubstanz diente GSH.

4. Isolierung und Bestimmung von Fettsäuresynthetase

Die Anreicherung der Fettsäuresynthetase wurde nach (Lit. 23) durchgeführt. Die mit Ammonsulfat zu 90% gesättigte, thioglykol- und K-ÄDTA-haltige (Lit. 23) Suspension des Enzyms wurde bei -15°C aufbewahrt. Vor Verwendung kleinerer Mengen des Enzyms (max. 15 mg) wurde zur Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile eine Gelfiltration an Sephadex G 25 durchgeführt (Säule: $1 \cdot 23 \text{ cm}$ oder $2 \cdot 20 \text{ cm}$; Eluant: $0,1 \text{ M}$ K-phosphat-puffer, pH 6,5). Der Lauf des Proteins wurde mit der UV-Lampe verfolgt. Größere Mengen Synthetase wurden nach (Lit. 23) durch Ultrazentrifugation von Zusätzen befreit.

Die Aktivität des Enzyms wurde mit Hilfe des optischen Tests (Lit. 7) (vgl. auch S. 6) bestimmt. Die Küvette ($d = 1 \text{ cm}$) enthielt im Gesamtvolumen $1,0 \text{ ml}$: $100 \mu\text{Mol}$ K-phosphat-puffer, pH 6,5, $0,38 \text{ mg}$ Serumalbumin, $10 \mu\text{Mol}$ Cystein, $0,1 \mu\text{Mol}$ NADPH, $0,05 \mu\text{Mol}$ Acetyl-CoA und $5\text{--}10 \mu\text{g}$ Enzym. Nach Aufnahme des Blindlaufes über 3 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von $0,1 \mu\text{Mol}$ Malonyl-CoA. $T = 25^\circ\text{C}$. Die Änderung der Extinktion bei $\lambda = 334 \text{ m}\mu$ war Meßgröße.

Eine Millieinheit (mE) ist die Enzymmenge, die unter den Bedingungen des Tests 2 nMol NADPH pro min umsetzt, was dem Verbrauch von 1 nMol Malonyl-CoA pro min entspricht.

II. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel B, I

1. Inkubation der Fettsäuresynthetase mit Malonyl-CoA

Die Reaktionsansätze, die sich in thermostatisierten Küvetten befanden, enthielten alle Zusätze des Synthetase-Standardtests (s.o.) mit Ausnahme von Acetyl-CoA.

Inkubationstemperatur: 25°C . Eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Malonyl-CoA-Konzentration auf $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ bzw. $7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ bewirkte weder eine Veränderung des Ausmaßes der Inaktivierung des Enzyms noch der Geschwindigkeit, mit der das Enzym in den weniger aktiven Zustand überführt wurde.

2. Rückisolierung von Fettsäuresynthetase nach der Inkubation mit Malonyl-CoA

a) Ammonsulfat-Fällung

In einen Zentrifugenbecher wurden gegeben: 15 mMol K-phosphat-puffer, pH 6,5, 100 μ Mol K-ÄDTA, 1,2 mg Enzym (spezif. Aktivität 860 mE/mg), Wasser ad 101 ml Gesamtvolumen und 8,75 μ Mol Malonyl-CoA. Ein Vergleichsansatz enthielt dieselben Substanzen mit Ausnahme von Malonyl-CoA. Nach einer Inkubation von 15 min bei 0°C wurden die Lösungen unter Rühren mit je 36,5 g Ammonsulfat (60% Sättigung) versetzt und 15 min nachgerührt. Die Fällungen wurden 2 h bei 15000 g abzentrifugiert und anschließend in je 3 ml eiskaltem 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5, aufgenommen. Die dabei erhaltenen schwach getrübbten Lösungen mußten noch über zwei Sephadex-G 25-Säulen filtriert werden (Säulen: 1 · 25 cm; Eluant: 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5, T: 4°C), um mitgerissene, die spätere Proteinbestimmung störende Ammonsulfat-Reste zu entfernen. Nach Ermittlung des Proteingehalts der Enzymlösungen wurde die enzymatische Aktivität bestimmt.

b) Gelfiltration

0,28 ml Enzymlösung (714 μ g Enzym; spezif. Aktivität 800 mE/mg) wurden mit 0,58 ml Malonyl-CoA-Lösung (4,32 μ Mol Malonyl-CoA) versetzt, 15 min bei 0°C inkubiert und im Kühlraum (T = 4°C) über eine Sephadex-G 25-Säule filtriert (Säule: 2 · 20 cm, Eluant: 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5). Hierauf wurden der Proteingehalt und 1,5 Stunden nach Beendigung der Gelfiltration die Aktivität der bei 0°C aufbewahrten Enzymlösung bestimmt.

III. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel B, II

1. Hemmung der Fettsäuresynthetase durch SH-Reagenzien

a) NÄM-Hemmung (Lit.26)

Eine 2,6 μ M Lösung des Enzyms in 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,7, wurde mit NÄM (frisch zubereitete 0,1 M Lösung in 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,7) bis zu einer Konzentration von 10^{-2} M versetzt und 5 min bei 0°C inkubiert. Dann wurde das überschüssige NÄM durch Zugabe der 1,5fachen Menge an Cystein abgefangen, und nach weiteren 5 min bei 0°C ein Aliquot der Lösung auf enzymatische Aktivität getestet.

b) JAA-Hemmung

Durchführung wie unter a). Die Inkubationszeiten wurden jedoch nach (Lit. 26) auf jeweils 15 min verlängert. Wie sich herausstellte, wurde das Enzym unter diesen Bedingungen zwar vollständig gehemmt, der Hemmstoff jedoch nur unvollständig abgefangen. Hierdurch und auch durch das überschüssige Cystein wurden z.T. Störungen bei der Bestimmung der Einzelaktivitäten der Synthetase verursacht. Es war deshalb in diesen Fällen notwendig, das Enzym nach erfolgter Hemmung durch Gelfiltration an Sephadex G 25 von den Zusätzen zu befreien (Säule, Eluant vgl. S. 93). Auch das NÄM-gehemmte Enzym wurde über Sephadex G 25 filtriert, wenn es erforderlich war, durch Cystein hervorgerufene, störende Nebenreaktionen auszuschalten.

2. Bestimmung von Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase

a) Acetyl-Transferase (Lit. 27)

In einem 10-ml-Zentrifugenglas mit Normalschliff befanden sich im Gesamtvolumen 1,5 ml: 100 μ Mol K-phosphat-puffer, pH 6,5, 0,30 mg Serumalbumin, 0,18 μ Mol [2- 14 C]Acetyl-CoA ($1,08 \cdot 10^5$ I pM/ μ Mol) und 1,2 μ Mol Pantethein. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10-60 μ g Fettsäuresynthetase gestartet und nach einer Inkubation von 10 min bei 25°C mit 0,1 ml 3 N Schwefelsäure gestoppt. Hierauf wurde der Ansatz zweimal mit je 1 ml 80proz. Phenol extrahiert. Die vereinigten Auszüge wurden mit 2 ml Petroläther und 8 ml Äther versetzt und zweimal mit je 2 ml Wasser ausgeschüttelt. Restliches Phenol wurde aus dem Wassereextrakt durch einmaliges Ausschütteln mit 2 ml Äther entfernt. Die so vorbereitete wäßrige Lösung der [14 C]Acetyl-Verbindungen wurde nun auf eine Dowex-2x8-Säule (mesh 200-400; Formiat-Form⁺); 0,5 · 10 cm) aufgetragen. Die Säule wurde nach dem Einziehen der Probe mit entgastem Wasser eluiert. Die ersten 30 ml der durchlaufenden Lösung wurden aufgefangen und ihr Gehalt an 2-[14 C]Acetyl-pantethein durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Da sich durch Wasser nur 79% des radioaktiven Acetyl-pantetheins aus dem Phenol-Petroläther-Äther-Gemisch extrahieren ließen (Tab. 26), wurden die erhaltenen Meßwerte auf 100% umgerechnet. 10% der Radioaktivität des eingesetzten [2- 14 C]Acetyl-CoA-Präparats wurden vom Ionenaustauscher nicht adsorbiert. Dieser (konstante)

⁺) Die Vorbereitung und Regeneration der Ionenaustauscher erfolgte nach (Lit. 106).

Betrag wurde von den gemessenen Daten stets abgezogen. 1 Millieinheit ist die Enzymmenge, die unter den Bedingungen des Testansatzes 1 nMol Acetylreste in 1 min überträgt.

Tabelle 26. Extraktion von Acetyl-pantethein aus dem bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes benutzten Phenol-Petroläther-Äther-Gemisch.

Probe Nr.	1	2	3	4	5	6
Ausbeute ^a	77 %	81 %	76 %	78 %	80 %	82 %

^a Ausbeute an Acetyl-pantethein, bestimmt mit Hilfe der verzögerten Nitroprussidreaktion (Lit. 92, 102). Einzelheiten der Extraktion s. Text.

b) Malonyl-Transferase (Lit. 27)

In einem 10-ml-Zentrifugenglas mit Schliffstopfen wurden 100 μ Mol K-phosphat-puffer, pH 6,5, 10 μ Mol Cystein, 0,30 mg Serumalbumin, 1,2 μ Mol Pantethein, 0,12 μ Mol [14 C]Malonyl-CoA ($1,67 \cdot 10^5$ I pM/ μ Mol) und 3-11 μ g Enzym im Gesamtvolumen 1,5 ml 10 min bei 25°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 0,1 ml 3 N Schwefelsäure wurde die Lösung zweimal mit je 2 ml 80proz. Phenol extrahiert. Die vereinigten Phenolauszüge wurden einmal mit 0,5 ml Wasser gewaschen, dann mit 5 ml Äther versetzt und zweimal mit je 2 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach Entfernung des im Wasserextrakt enthaltenen Phenols durch zweimaliges Ausschütteln mit je 2 ml Äther wurde die Lösung auf eine Dowex-2x8-Säule (mesh 200-400; Formiat-Form ⁺); 2,5 · 0,5 cm) aufgetragen. Die Säule wurde nach dem Einsickern der Probe mit 100 ml entgastem Wasser gewaschen. Sodann wurde das radioaktive Malonyl-pantethein mit 60 ml 1 M Ameisensäure eluiert und durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Die Ameisensäure löste neben dem [14 C]Malonyl-pantethein stets einen konstanten Betrag von 5% der eingesetzten Radioaktivität von der Säule. Dieser wurde von den Meßwerten stets abgezogen. Als 1 Millieinheit ist diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Bedingungen des Testansatzes in 1 min den Umsatz von 1 nMol Malonylresten bewirkt.

c) β -Ketoacyl-Reduktase (Lit. 6)

In eine Küvette (d = 1 cm) wurden 100 μ Mol K-phosphat-puffer, pH 6,5, 10 μ Mol Cystein, 0,12 μ Mol NADPH, 2-15 μ g Enzym und soviel Wasser pipettiert, daß das Gesamtvolumen

⁺) Vgl. Fußnote S. 95.

nach dem späteren Zusatz des Modellsubstrats 1,0 ml betrug. Nach Aufnahme des Blindlaufs über 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μMol S-Acetacetyl-N-acetylcysteamin gestartet. $T = 25^{\circ}\text{C}$. Meßgröße: Extinktionsänderung bei $\lambda = 334 \text{ m}\mu$.

1 Millieinheit ist die Enzymmenge, die unter den angegebenen Meßbedingungen 1 nMol NADPH in 1 min umsetzt.

d) β -Hydroxyacyl-Dehydratase (Lit. 6)

In 4 Quarzküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) wurden die in Tab. 27 angegebenen Zusätze pipettiert.

Tabelle 27.

Küvette Nr.	I	II	III	IV
Tris/HCl-puffer, pH 7,5	800 μMol	800 μMol	800 μMol	800 μMol
K-phosphat-puffer, pH 6,5 ^a	-	10-90 μMol	10-90 μMol	-
K-ÄDTA	1 μMol	1 μMol	1 μMol	1 μMol
D,L-S- β -Hydroxy-butyryl-N-acetyl-cysteamin	30 μMol	-	30 μMol	-
H ₂ O	ad 3,0 ml	ad 3,0 ml	ad 3,0 ml	ad 3,0 ml
Enzymlösung	0,1-0,9 ml	-	-	0,1-0,9 ml

^a Das Enzym war stets in 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5, gelöst. Es mußte daher darauf geachtet werden, daß die Konzentration an K-phosphat-puffer in allen 4 Küvetten gleich groß war.

Die Küvetten I und II wurden hintereinander in den Meßstrahlengang, die Küvetten III und IV hintereinander in den Vergleichsstrahlengang des registrierenden Spektralphotometers (Cary) gestellt. Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von 0,2-1,4 mg Enzym wurde die Extinktionsänderung bei $\lambda = 263 \text{ m}\mu$ gemessen.

T = Raumtemperatur.

1 Millieinheit ist die Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen 1 nMol Modellsubstrat in 1 min umsetzt.

e) α,β -Dehydroacyl-Reduktase (Lit. 6)

Eine Küvette (d = 1 cm) enthielt im Volumen 1,7 ml: 500 μ Mol K-phosphat-puffer, pH 7,5, 1 μ Mol K-ÄDTA, 0,5 μ Mol NADPH und 0,25-1,0 mg Enzym. Nach Zusatz von 0,3 ml S-Crotonyl-N-acetylcysteamin-Lösung (30 μ Mol) wurde im registrierenden Spektralphotometer (Cary) die Extinktionsänderung bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ gegen eine Vergleichsküvette mit allen Zusätzen außer dem Substrat gemessen. T = Raumtemperatur.

1 Millieinheit ist die Enzymmenge, die unter den Bedingungen des Tests in 1 min 1 nMol NADPH umsetzt, was dem Verbrauch von 1 nMol Modellsubstrat pro min entspricht.

f) Palmityl-Transferase (Lit. 26)

Der Inkubationsansatz, der sich in einem 10-ml-Zentrifugenglas befand, enthielt im Gesamtvolumen 1,0 ml: 100 μ Mol K-phosphat-puffer, pH 6,5, 0,75 mg Serumalbumin, 25 nMol Palmityl-CoA, 12,8 μ Mol GSH und 30,2 nMol [^{14}C]CoA ($1,49 \cdot 10^5 \text{ IpM}/\mu\text{Mol}$). Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 25°C wurde die Übertragungsreaktion durch Zugabe von 1-19 μg Enzym gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min auf 25°C gehalten. Dann wurden 0,05 ml 3 M Trichloressigsäure zugesetzt und der Niederschlag zusammen mit 25 nMol Palmityl-CoA als Träger abzentrifugiert. Die Fällung wurde zweimal mit je 0,5 ml 5proz. Trichloressigsäure sorgfältig (unter Aufwirbeln mit dem Glasstab) gewaschen und anschließend mit 0,4 ml 4proz. Ammoniak wieder in Lösung gebracht. Die Radioaktivität eines Aliquots dieser Lösung wurde bestimmt.

1 Millieinheit ist diejenige Enzymmenge, die unter den Bedingungen des Testansatzes pro min 1 nMol Palmityl-CoA umsetzt.

IV. Versuchsbeschreibungen zu Kapitel B, III

1. Isolierung von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase

0,03-2,63 g durch Ultrazentrifugation von Ammonsulfat befreiter Fettsäuresynthetase wurden in einer Konzentration von 20 mg/ml (8,7 μM) in eiskaltem 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5 gelöst. Nach Zugabe einer neutralisierten, wäßrigen 0,1 M Lösung von Ellman's Reagenz bis zur Endkonzentration 1,0 mM wurde die Mischung 1 h bei Raumtemperatur mäßig gerührt. Dann wurde das intensiv gelb gefärbte Reaktionsgemisch bei 0°C mit einer 2,3 mM Lösung von [^{14}C]Acetyl-CoA ($1,95-2,05 \cdot 10^7 \text{ IpM}/\mu\text{Mol}$)

bis zur Konzentration 0,17 mM versetzt und 5 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in das fünffache Volumen eiskalter 0,3 M Trichloressigsäure eingerührt und das ausgefallene radioaktive Acetyl-Enzym in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde sechsmal mit je 1-20 ml eiskalter 0,3 M Trichloressigsäure und zuletzt einmal mit 1-20 ml Äther sorgfältig gewaschen.

Zur Denaturierung des [^{14}C]Acetyl-Enzyms mit Harnstoff wurde der Lösung des Enzyms bei 0°C unter Rühren eine 11 M Harnstofflösung bis zur Endkonzentration 8 M zugesetzt. Darauf wurde das Gemisch im Kühlraum ($T = 4^{\circ}\text{C}$) zweimal gegen das $2,5 \cdot 10^3$ fache Volumen 0,1 M K-phosphat-puffer, pH 6,5, dialysiert und das ausgefallene Protein durch erneute Dialyse gegen 8 M Harnstoff wieder in Lösung gebracht.

Ergänzende Angaben zu den Versuchen auf S. 28:

Es wurden je 31 mg [^{14}C]Acetyl-Enzym (Fettsäuresyntheseaktivität des Enzyms vor der Beladung: 1510 mE/mg) mit TCE bzw. mit Harnstoff gefällt. Die spezifische Beladung beider Präparate betrug 3,2 Mol Acetylreste/Mol Fettsäuresynthetase.

Im nachfolgend geschilderten Versuch wurden von 280 mg Fettsäuresynthetase (Fettsäuresyntheseaktivität: 1160 mE/mg) die Hälfte mit Ellman's Reagenz behandelt (Fettsäuresyntheseaktivität nach der Hemmung: 44 mE/mg). Anschließend wurden der ungehemmte und der gehemmte Teil des Enzyms mit [^{14}C]Acetyl-resten beladen. Die spezifische Beladung der erhaltenen [^{14}C]Acetyl-Enzyme betrug 2,6 bzw. 2,8 Mol Acetylreste/Mol Fettsäuresynthetase.

2. Spaltung von [^{14}C]Acetyl-Y-Fettsäuresynthetase durch proteolytische Enzyme

a) Peptische Spaltung (Lit. 18, 22, 23)

Das mit Trichloressigsäure denaturierte [^{14}C]Acetyl-Enzym wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,01 N HCl suspendiert und nach Zusatz von Pepsin (3x krist., reinst, 2500 E/mg) 39 h bei Raumtemperatur gerührt. Weitere Einzelheiten vgl. (Lit. 23).

Das Enzym/Substrat-Verhältnis betrug stets 1 mg Pepsin/10 mg [^{14}C]Acetyl-Enzym.

Im Versuch von S. 28 wurden die [^{14}C]Acetyl-Enzympräparate abweichend von der obigen Vorschrift nur jeweils 30 h mit Pepsin verdaut.

b) Tryptische Spaltung

Die tryptische Verdauung wurde unter Stickstoff in einem Autotitrator durchgeführt.

Das TCE-gefällte [^{14}C]Acetyl-Enzym wurde mit Hilfe eines hochtourigen Homogenisators feinst zerteilt und in einer Konzentration von 6 mg/ml in wäßriger 1 mM CaCl_2 -Lösung suspendiert. Nach Zusatz einer Lösung von Trypsin (2x krist., reinst, 180 EU/mg oder DCC-behandelt, p.a., 190 EU/mg) in 0,001 N HCl (10 mg/ml) wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert wurde dabei durch Zugabe von 0,1-1 N NaOH auf $6,95 \pm 0,05$ gehalten. Nach einer Inkubationszeit von 15 h wurde die Suspension mit Eisessig auf pH 3,0 gebracht. Das Ungelöste wurde bei 37000 g abzentrifugiert und dreimal mit 5proz. Essigsäure ausgewaschen. Der lösliche Teil des Hydrolysats wurde unter Zusatz eines Tropfens n-Octanol am Rotationsverdampfer eingeeengt (Badtemperatur: 30°C) und anschließend der Gelfiltration unterworfen.

Das Enzym/Substrat-Verhältnis war bei allen Verdauungen 1 mg Trypsin/10 mg [^{14}C]Acetyl-Enzym.

3. Trennverfahren für Peptide und Aminosäuren

a) Chromatographie an Ionenaustauschern

Vorbereitung der Ionenaustauscher. DEAE-Sephadex A-25 wurde in destilliertem Wasser zur Quellung gebracht und auf einer Nutsche mit den nachstehenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge gewaschen:

0,5 N NaOH - H_2O - 0,5 N HCOOH oder 0,5 N CH_3COOH - H_2O - Startpuffer.

CM- und SE-Sephadex C-25 wurden nach ihrer Quellung in Wasser mit den folgenden Lösungen gewaschen:

0,5 N HCl - H_2O - 2 M Pyridin - H_2O - Startpuffer.

Die Waschprozeduren wurden jeweils solange fortgesetzt, bis der pH-Wert der von der Nutsche abgesaugten Lösung mit dem der zugegebenen übereinstimmte.

Die Ionenaustauscher wurden in Startpuffer suspendiert und die Suspensionen nach Entlüftung in die zu einem Viertel mit Puffer gefüllten Säulen eingegossen. Die fertig gepackten Säulen wurden solange mit Startpuffer durchspült, bis der pH-Wert des Eluats mit dem des eingebrachten Puffers übereinstimmte. Gleichgewichtseinstellung wurde i.allg. nach Durchfluß des 3-4fachen Volumens der Säulenfüllung beobachtet.

Die Vorbereitung des Beckman-M75/203-Ionenaustauscherharzes erfolgte nach (Lit. 107).

Probenauftrag und Elution. Die zu trennende Probe wurde in konzentrierter Form auf den erforderlichen pH-Wert gebracht. Dieser lag bei der Chromatographie an DEAE-Sephadex um 0,5 pH-Einheiten über und bei der Chromatographie an CM- und SE-Sephadex um 0,5 pH-Einheiten unter dem pH des Startpuffers (Lit. 106). Nach dem Abhebern des Pufferüberstandes wurde die Probe mit einer Pipette auf die Säule aufgetragen. Sobald die Flüssigkeit eingezogen war, wurde dreimal mit wenig Puffer vom pH-Wert der Probelösung nachgespült und anschließend die Entwicklung der Säule begonnen. Zur Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit war es in einigen Fällen erforderlich, die Elution unter einem Druck von 1-2 m Wassersäule durchzuführen. Bei der Gradientenelution wurde ein geschlossenes Mischgefäß verwendet, in welches die zur Erzeugung des Gradienten verwendeten Lösungen unter konstantem Druck eingeführt wurden. Das Volumen der Fraktionen wurde durch Tropfenzählung oder bei größeren Volumina (ab 5 ml) durch Gewichtsmessung mittels einer Siphonwippe (LKB) festgelegt.

Der Verlauf der Elution wurde mit der Ninhydrinreaktion (Lit. 41, 42, 23) und durch Messung der Radioaktivität verfolgt.

Zu vereinigende Fraktionen wurden mit der Pipette in einen Spitzkolben geeigneter Größe überführt und die Fraktionsgläser noch zweimal mit je 1 ml H₂O nachgespült. Anschließend wurde die Lösung gefriergetrocknet, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und nach Überprüfung des pH-Wertes (gewünschter pH-Wert: 5-6,5) bei -15°C aufbewahrt. Beim Vorliegen eines größeren Volumens wurde die Lösung vor der Lyophilisation am Rotationsverdampfer eingeengt (Badtemperatur: 30-35°C). Durch Zusatz eines Tropfens n-Octanol ließ sich Schaumbildung vermeiden (Lit. 106).

Nach beendeter Chromatographie wurden die Säulen entleert und die Ionenaustauscher mit den bei "Vorbereitung" aufgeführten Verfahren regeneriert.

b) Gelfiltration

Die Bereitung der Sephadex-Säulen und die Durchführung der Chromatographie erfolgten nach (Lit. 60). Vor Gebrauch wurden die Säulen mit dem Vierfachen ihres Volumens an Elutionsmittel äquilibriert.

c) Papierelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden in Hochvoltelektrophoresekammern (Savant) bei 6000 V durchgeführt. Die Kammern enthielten gefiltertes Varsol als Kühlflüssigkeit und die folgenden Pufferlösungen:

Tank I : Ameisensäure/Essigsäure/Wasser	4 : 1 : 45 (v/v); pH 1,9.
Tank II : Pyridin/Essigsäure/Wasser	3,3 : 33 : 1463,7 (v/v); pH 3,5.
Tank III: Pyridin/Essigsäure/Wasser	25 : 1 : 349 (v/v); pH 6,4.

Es wurde stets Whatman-3MM-Papier vom Format 46 · 110 cm verwendet. Das Papier und alle mit ihm in Kontakt kommenden Gegenstände wurden nur mit Handschuhen berührt. Diese Vorsichtsmaßnahme wurde auch bei der Papierchromatographie angewendet.

Bei präparativen Arbeiten wurde die zu trennende Probe mit einer Pipette in einer 1 cm breiten Zone auf das trockene, in den Halterahmen eingespannte Papier aufgetragen. Maximale Substanzbelastung des Papiers: 0,7 mg/cm. Vom Papierrand wurden jeweils 5 cm freigelassen. Die Lage der Startlinie richtete sich nach der Zusammensetzung des Peptidgemischs. Es wurde die Regel befolgt, die Probe möglichst weit von den in die Pufferlösungen eintauchenden Papierenden entfernt aufzutragen, um eine Vermischung der Substanzen mit der Pufferfront zu vermeiden. Während die Probelösung trocknete, wurde das Papier gleichmäßig mit Puffer besprüht. Dabei wurde die Startzone als schmaler Streifen freigelassen, so daß durch das Zusammenfließen des Puffers die Auftragszone verschärft wurde. Die Dauer der Elektrophorese betrug 1-4 h. Nach ihrer Beendigung wurde das Pherogramm bei einer Temperatur von 30-35°C getrocknet. Die getrennten Substanzen wurden durch Radioautographie und durch Besprühen mit geeigneten Reagenzien lokalisiert.

Zur Radioautographie wurde Agfa-Röntgenpapier (35,6 · 43,2 cm) verwendet, welches zwischen zwei Kunststoffplatten mittels Schraubzwingen auf das Pherogramm gepreßt wurde. Die Belichtungszeit betrug je nach der Menge der vorhandenen Radioaktivität 1-7 Tage. Die Entwicklung und Fixierung des belichteten Röntgenpapiers erfolgte nach (Lit. 23).

Aminosäuren und Peptide mit freien Aminoendgruppen wurden durch Besprühen mit einer 0,2proz. Lösung von Ninhydrin in Aceton und Erhitzen (15 min) auf 100°C sichtbar gemacht. N-Acetyl-Aminosäuren und N-Acetyl-Peptide wurden durch Anfärben mit Chlor/Tolidin nach (Lit. 74) geortet. Dazu wurde der zu untersuchende Abschnitt des

Pherogramms zunächst 13 min mit Chlor-, dann 5 sec mit Ammoniakdämpfen behandelt und anschließend mit einer Lösung von 3,5 g Tolidin und 16,6 g Kaliumjodid in 2 l 1proz. Essigsäure besprüht.

Zu eluierende Zonen wurden mit Bleistift eingezeichnet, ausgeschnitten und bei 25°C mit möglichst wenig 5proz. Essigsäure oder Wasser eluiert. Konzentrierung und Aufbewahrung der Eluate wie unter "Ionenaustauscherchromatographie" beschrieben. Wo es zweckmäßig erschien, wurde auf die Elution verzichtet und die ausgeschnittene Zone auf der Nähmaschine mit einer Zickzack-Naht in einen neuen, für den nächsten Reinigungsschritt vorgesehenen Papierbogen eingenäht (Lit. 108, 109).

Bei der vergleichenden Papierelektrophorese wurden die unbekannte Substanz und die Vergleichssubstanz in der in Abb. 66 wiedergegebenen Weise in Form von kreisförmigen Flecken (Durchmesser: 0,5 cm) auf der Startlinie aufgetragen.

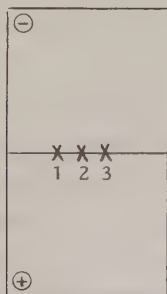


Abb. 66. Startpositionen der Substanzen bei der vergleichenden Papierelektrophorese.

1, Vergleichssubstanz; 2, Mischung aus Vergleichssubstanz und unbekannter Substanz; 3, unbekannte Substanz.
Der Abstand zwischen den Startpunkten betrug jeweils 5 cm.

Die Pherogramme wurden im Radiopapierchromatograph und durch Besprühen mit den oben aufgeführten Reagenzien ausgewertet.

d) Papier- und Dünnschichtchromatographie

Papierchromatographie. Es wurde ausschließlich mit der absteigenden Methode gearbeitet. Für kleine Substanzmengen (100 µg/cm) wurde Whatman-1-, für größere Mengen (0,7 mg/cm) Whatman-3 MM-Papier verwendet. Das Format betrug 46 · 56 cm. Das Auftragen der Probe erfolgte in einer 0,5 cm breiten Zone, wobei je 5 cm von den Randteilen des Papiers freibleiben. Die benutzten Laufmittel sind in Tab. 28 zusammengestellt. Vor Beginn der Chromatographie wurden die Papierbögen über Nacht mit den Dämpfen des betreffenden Lösungsmittelsystems äquilibriert. Die Chromatogramme wurden stets bei 25°C entwickelt, was 12-24 h in Anspruch nahm. Trocknung, Auswertung und Elution wie bei "Papierelektrophorese" beschrieben.

Bei der vergleichenden Papierchromatographie wurden die Substanzen punktförmig in der in Abb. 66, S. 103 gezeigten Weise aufgetragen.

Tabelle 28. Laufmittel für Papier- und Dünnschichtchromatographie.

Lösungsmittelsystem	Zusammensetzung		
A	tert.-Butanol/Ameisensäure/Wasser	14 : 3 : 3	(v/v)
B	n-Butanol/Essigsäure/Wasser	4 : 1 : 5 (obere Phase)	(v/v)
C	n-Butanol/Essigsäure/Wasser	4 : 1 : 1	(v/v)
D	n-Butanol/Essigsäure/Wasser	3 : 1 : 1	(v/v)
E	Essigester/Pyridin/Essigsäure/Wasser	5 : 5 : 1 : 3	(v/v)
F	n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser	15 : 10 : 3 : 12	(v/v)

Dünnschichtchromatographie. Als Träger dienten Kieselgel-G-Platten [Schichtdicke: 0,25 mm; hergestellt nach (Lit. 110)], die unmittelbar vor Gebrauch 1 h bei 110°C aktiviert wurden. Die zu vergleichenden Proben wurden mit ausgezogenen Pasteur-Pipetten in der in Abb. 66, S. 103 angegebenen Reihenfolge punktförmig aufgetragen (Abstand zwischen den Startpunkten: 2,5 cm) und bei 25°C chromatographiert. Die benutzten Laufmittel sind aus Tab. 28 zu ersehen. Nach Trocknung der Platten bei Raumtemperatur wurden die Substanzen in der bei "Papierelektrophorese" geschilderten Weise sichtbar gemacht. Radioaktive Bereiche auf den Chromatogrammen wurden mit dem Dünnschicht-Scanner lokalisiert.

4. Aminosäureanalyse (Lit. 53, 56, 57)

4-10 nMol des zu analysierenden [^{14}C]Acetyl-Peptids wurden in einem dickwandigen Reagenzglas (Jenaer Glas) gefriergetrocknet und anschließend in 0,2-1,0 ml 6 N HCl (über SnCl_2 bidestilliert) gelöst. Die Lösung wurde im Trockeneis/Aceton-Bad eingefroren und das Reagenzglas auf 10^{-3} Torr evakuiert. Dann wurde die Probe unter vorsichtigem Schütteln wieder aufgetaut und das Rohr abgeschmolzen. Nach 22stündigem Erhitzen auf $108 \pm 2^\circ\text{C}$ wurde die Bombe geöffnet und das Hydrolysat im Rotations-

verdampfer ⁺⁾ zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und erneut eingedampft. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Hierauf wurde das von Salzsäure befreite Aminosäuregemisch in 0,5-1,0 ml 0,2 M Na-citrat-puffer, pH 2.2 aufgenommen und im Aminosäureanalysator untersucht. Der Fehler bei der Analyse einer 5 nMol Probe lag bei $\pm 10\%$.

Cystein und Cysteamin wurden nach Oxydation der Peptide mit Perameisensäure und anschließender salzsaurer Hydrolyse als Cysteinsäure bzw. als Taurin bestimmt (Lit. 111).

Zur Untersuchung ihres Tryptophangehaltes wurden die Peptide nach der Methode von Matsubara (Lit. 61) in Gegenwart von Thioglykolsäure (4 Vol. %) mit Salzsäure hydrolysiert und die Spaltgemische im Aminosäureanalysator untersucht. Wir beobachteten im Kontrollversuch mit synthetischem Tryptophyl-leucin, daß bei Zusatz von Thioglykolsäure nur $30 \pm 5\%$ des vorhandenen Tryptophans nach der Hydrolyse zerfallen waren. Zum qualitativen Test auf Tryptophan wurde Ehrlich's Reagenz verwendet (Lit. 45).

Glutamin wurde aus den Peptiden durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt (CPA-Abbau) und im Aminosäureanalysator bestimmt. Seine Abtrennung von Serin wurde durch Vergrößerung der Säulenpackung von $55 \cdot 0,9$ cm auf $60 \cdot 0,9$ cm erreicht.

Das Peptid T₄ wurde zur Bestimmung seiner Aminosäurezusammensetzung mit 6 N HCl hydrolysiert, die 4 Vol. % Thioglykolsäure enthielt.

5. Endgruppenbestimmung und Sequenzanalyse

a) Aminoendgruppenbestimmung mit Dansylchlorid

Die Markierung der Aminoendgruppen der Peptide mit Dansylchlorid und die Hydrolyse der dansylierten Peptide wurden in allen Einzelheiten nach (Lit. 47) durchgeführt.

Die Dansyl-Aminosäuren wurden nach (Lit. 112) durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln A und B identifiziert. Sehr geringe Mengen an Dansyl-Aminosäuren (unter 1 nMol) wurden nach (Lit. 113) auf Polyamidfolien in den Laufmitteln 1 und 2 getrennt.

⁺⁾ Zur Absorption der radioaktiven Essigsäure wurde in die Vorlage Natronlauge gegeben und in die Vakuumleitung der Apparatur eine mit Natronplättchen gefüllte Gaswaschflasche eingebaut.

b) Edman-Abbau

Der Abbau von 10 nMol Peptid folgte der Vorschrift von Gray (Lit. 63) mit der Abänderung, daß nach Kupplung des Peptids mit Phenylsenföhl das überschüssige Reagenz im Hochvakuum (10^{-5} Torr) unter halbstündigem Erhitzen der Probe auf 60°C entfernt wurde.

Nach der Durchführung der Abbauposition wurde entweder nach (Lit. 63) mit n-Butylacetat oder nach (Lit. 64) mit Benzol extrahiert. Anschließend wurde das Peptid mit Salzsäure hydrolysiert und das Spaltgemisch der Aminosäureanalyse unterworfen.

c) Abbau mit Leucinaminopeptidase

0,065 ml einer Lösung von Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen (reinst; 900 EU/mg; 2 mg/ml) in 0,1 M Tris/HCl-puffer, pH 8,2, wurden mit 0,624 ml 0,05 M Tris/HCl-puffer, pH 8,0, und 0,076 ml 0,1 M $MgCl_2$ versetzt. Die Mischung wurde 30 min bei 40°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe einer Lösung von 10 nMol Peptid in 0,09 ml 0,05 M Tris/HCl-puffer, pH 8,0 und 0,01 ml 0,1 M $MgCl_2$. Nach 4 h bei 40°C wurde das Reaktionsgemisch mit Eisessig auf pH 3 gebracht und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 0,5 ml 0,2 M Na-citrat-puffer, pH 2,2, aufgenommen und im Aminosäureanalysator untersucht. Im Kontrollversuch wurde eine gleiche Menge Enzym ohne Zusatz von Substrat einer identischen Behandlung unterworfen.

d) Abbau mit Carboxypeptidase A (Lit. 71, 72)

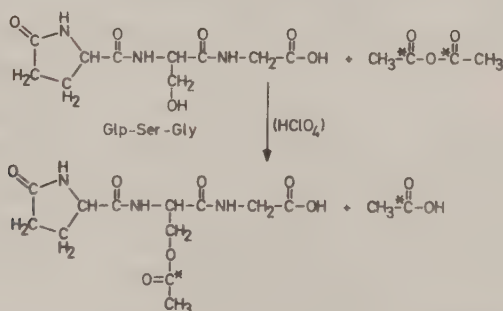
Bereitung der Enzymlösung. 0,025 ml einer wäßrigen Suspension von Carboxypeptidase A (reinst, DFP-behandelt, 35 EU/mg, 53 mg/ml) wurden mit 1 ml eiskaltem H_2O verdünnt und 15 min bei 37000 g zentrifugiert. Nach dem Abhebern des Überstandes wurde das sedimentierte Enzym mit 0,50-3,09 ml eiskalter 10proz. LiCl-Lösung versetzt und durch halbstündiges Rühren im Eisbad in Lösung gebracht.

Verdauung. 10-50 nMol Peptid wurden in einem Zentrifugenglas mit Normalschliff gefriergetrocknet und anschließend in 0,4 ml 0,1 M Tris/HCl-puffer, pH 8,0, gelöst. Nach Zusatz von 0,02 ml Enzymlösung (1/10-1/200 nMol CPA/nMol Peptid) wurde das Reaktionsgemisch im verschlossenen Gefäß bei 25°C oder 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden der Lösung 5-15 nMol-Aliquote entnommen, mit Eisessig auf pH 3 gebracht und sofort im Trockeneis/Aceton-Bad eingefroren. Die Proben wurden lyophilisiert, die Rückstände in je 0,5 ml 0,2 M Na-citrat-puffer, pH 2,2, gelöst und der Aminosäureanalyse unterworfen. In einem Parallelversuch wurden 0,02 ml der benutzten Enzymlösung

sung ohne Zusatz von Substrat unter identischen Bedingungen inkubiert und mit einer gleichlaufenden Probenentnahme überprüft, ob aus dem Enzym Aminosäuren freigesetzt wurden. Eine solche Abspaltung wurde in keinem Fall beobachtet.

Zur präparativen Isolierung der Abbauprodukte T_3C_1 und T_3C_2 (Versuche von Abb. 48, 49; S. 65,66) wurden die Reaktionsgemische nach dem Ansäuern mit Eisessig auf pH 3 der Gelfiltration unterworfen. Abweichend von der oben angegebenen Vorschrift wurde das Peptid im Versuch von Abb. 49 in 1,0 ml Puffer gelöst und mit 0,052 ml Enzymlösung versetzt.

6. Darstellung von Pyrrolidonyl-(O-[^{14}C]acetyl)seryl-glycin



50 mg (0,18 mMol) sorgfältig über P_2O_5 getrocknetes Pyrrolidonyl-seryl-glycin wurden in 0,36 ml einer Mischung von 1,08 ml 70proz. $HClO_4$ ($\rho = 1,67$) und 18,90 ml 99-100proz. Essigsäure ($\rho = 1,05$) gelöst und bei $0^\circ C$ mit 0,11 ml (1,16 mMol) [$1-^{14}C$]Acetanhydrid (0,21 mCi/mMol) versetzt. Zur Vervollständigung der Acetylierung wurde das Reaktionsgemisch noch 1 h bei Raumtemperatur im verschlossenen Kolben stehengelassen. Dann wurde das überschüssige [^{14}C]Acetanhydrid mit 0,007 ml (0,39 mMol) H_2O hydrolysiert. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurden der Mischung bei $0^\circ C$ 0,034 ml (0,30 mMol) Amylamin und anschließend 5 ml abs. Äther zugesetzt. Das sich abscheidende ölige Produkt ließ sich nicht zur Kristallisation bringen. Der Äther wurde daraufhin abgesaugt, das Öl dreimal mit je 2 ml abs. Äther gewaschen und in 0,04 ml H_2O gelöst. Nach erneuter Abscheidung mit 5 ml abs. Äther und dreimaligem Auswaschen mit je 2 ml abs. Äther wurde das Öl zur weiteren Entfernung von radioaktiver Essigsäure 2 Tage im Exsikkator bei 10^{-3} Torr über KOH aufbewahrt. Die zum Schluß erstarrte Substanz wurde in wenig abs. Äthanol gelöst und die Lösung in der Siedehitze

mit abs. Äther versetzt, bis eben eine Trübung zu beobachten war. Nach dem Abkühlen und Stehenlassen über Nacht bei 4°C wurden farblose Kristalle erhalten, die auf der Nutsche gründlich mit abs. Äther gewaschen wurden. Ausbeute: 43 mg (75% d. Th.).
Spezif. Radioaktivität: $3,76 \cdot 10^7$ IpM/mMol. Schmp.: 84–87°C.

Elementaranalyse ^{†)}

Ber. C 45,7% H 5,4% N 13,3%
Gef.

Einwaage	C	H	N
0,719 mg	44,8%	6,2%	–
1,256 mg	–	–	12,4%

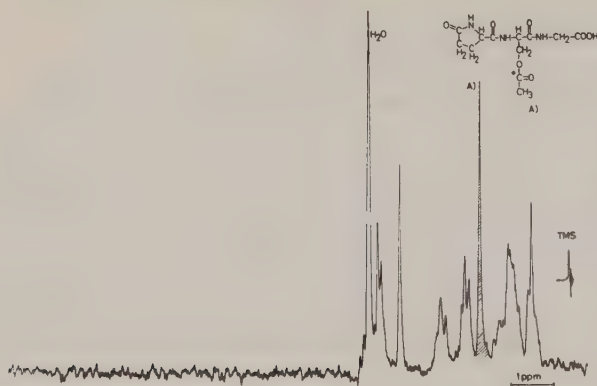
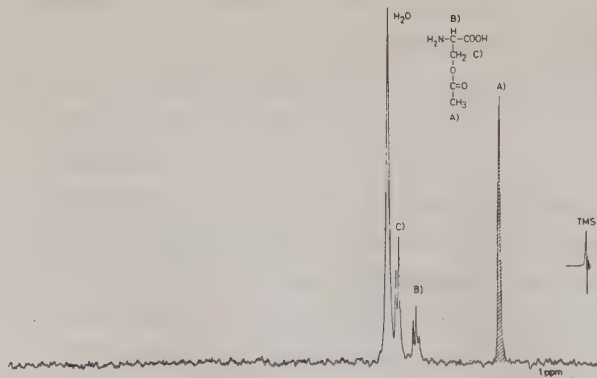


Abb. 67.

NMR-Spektrum ^{††)} von
Pyrrolidonyl-(O-[¹⁴C]acetyl)-
seryl-glycine.

Lösungsmittel: D₂O; externer
Standard: TMS; Sweep-Bereich:
1000 Hz.



Die Substanz zeigte im Kernresonanzspektrum (Abb. 67) das charakteristische Signal der Methylprotonen der Acetylgruppe ($\tau = 7,87$ ppm), wie aus einem Vergleich mit dem Spektrum des O-Acetyl-serins hervorging (Abb. 68).

7. Hydrolyse von Fettsäuresynthetase zur Ermittlung ihres Carnitin-Gehalts

516 mg Fettsäuresynthetase (spezif. Aktivität 1740 mE/mg) wurden durch Dialyse gegen 0,01 M K-phosphat-puffer, pH 6,5, sorgfältig von Ammonsulfat befreit. Dann wurde die Enzymlösung in einem Bombenrohr gefriergetrocknet. Nach Zusatz von 21 ml 6 N HCl (über SnCl_2 bidestilliert) wurde das Rohr unter Vakuum abgeschmolzen (vgl. S. 104) und 22 h auf 105°C erhitzt. Anschließend wurde das Hydrolysat im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in wenig H_2O aufgenommen, erneut eingedampft und nach dem Wiederauflösen in 8 ml 0,5 M Pyridin/HCl-puffer, pH 2,2, der Ionenaustauscherchromatographie unterworfen.

8. Peroxydation von harnstoff-denaturierter $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Fettsäuresynthetase

10 mg des nach der Vorschrift von S. 99 mit Harnstoff denaturierten $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms (Fettsäuresyntheseaktivität des Enzympräparats vor der Beladung 1510 mE/mg, spezif. Beladung 3,2 Mol Acetylreste/Mol Enzym) wurden gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mit 2 ml nach (Lit. 23) bereiteter eiskalter Perameisensäurelösung versetzt und 4 h bei 0°C gehalten. Anschließend wurde die Lösung lyophilisiert, die zurückbleibende Substanz in 2 ml H_2O suspendiert und erneut gefriergetrocknet. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Dann wurde das Protein mit 2 ml einer 11 M Harnstofflösung versetzt und durch 4stündiges Rühren bei Raumtemperatur wieder in Lösung gebracht. Hierbei und auch bei allen im folgenden geschilderten Operationen kam es zu keiner Abspaltung von $[^{14}\text{C}]$ Essigsäure aus dem denaturierten Enzym. Zur Entfernung des noch vorhandenen Phosphat-puffers wurde die Lösung bei Raumtemperatur zweimal 4 h gegen je 5 l H_2O dialysiert und das ausgefallene Protein durch 6stündige Dialyse gegen 8 M Harnstoff aufs neue gelöst. Aliquote dieser Lösung wurden in die Verseifungsversuche eingesetzt.

9. Verseifung der $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptide und des denaturierten $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms

Die gefriergetrocknete $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Verbindung wurde mit 0,1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -puffer (pH = 10,0; 10,5 bzw. 10,75) oder mit 1 N NaOH versetzt und im verschlossenen Gefäß

bei 25°C oder 60°C inkubiert. Der Lösung wurden zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn 0,2 ml Proben entnommen, die sofort in einem kleinen Reagenzglas mit 0,1 ml Ameisensäure vermischt wurden. Aliquote dieser Lösungen wurden unter dem Abzug auf Whatman-1-Papier (3 · 7 cm) aufgetragen, mit der Rotlichtlampe eingetrocknet und im Scintillationsspektrometer ausgezählt.

Bei einem Teil der Versuche waren die Inkubationslösungen 8 M an Harnstoff. Nach Messungen mit der Glaselektrode verursachte die Anwesenheit von Harnstoff eine Erhöhung der pH-Werte der benutzten Carbonat-puffer-Lösungen von 10,0, 10,5 bzw. 10,75 auf 10,8, 11,2 bzw. 11,6.

10. Tryptische Spaltung des [¹⁴C]Acetyl-Peptids P₁

14 bzw. 10 nMol Peptid P₁ wurden in 6 ml H₂O (1 mM an CaCl₂) gelöst und mit 1,4 bzw. 1,0 nMol Trypsin (DCC-behandelt, p.a., 190 EU/mg, 10 mg/1 ml 0,001 N HCl) versetzt. Die Reaktionsgemische wurden im Autotitrator unter Stickstoff 14 bzw. 10 h bei einer Temperatur von 37°C gerührt und die pH-Werte dabei durch Zugabe von 0,01 N NaOH auf $6,95 \pm 0,05$ bzw. $7,50 \pm 0,05$ gehalten. Anschließend wurden die Lösungen mit Eisessig auf pH 3,0 gebracht, im Rotationsverdampfer eingengt (Badtemperatur 35°C) und der Gelfiltration unterworfen.

D. Zusammenfassung

1. Die Einwirkung von Malonyl-CoA auf Fettsäuresynthetase verursachte in schneller Reaktion eine Teilinaktivierung des Enzyms, die durch Entfernung des Malonyl-CoA wieder rückgängig gemacht werden konnte.
2. Mit Hilfe von Modellreaktionen wurde der Einfluß von SH-Giften auf sechs Enzymkomponenten der Fettsäuresynthetase untersucht. Eine Hemmung wurde nicht beobachtet, woraus geschlossen wurde, daß außer den bereits bekannten "zentralen" und "peripheren" keine weiteren Sulfhydrylgruppen am katalytischen Prozeß der Fettsäuresynthese beteiligt sind.
3. Zur Identifizierung der essigsäure-übertragenden Wirkstelle im aktiven Zentrum ihrer Acetyl-Transferase-Komponente wurde Fettsäuresynthetase nach Blockierung der freien SH-Gruppen durch Einwirkung von $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-CoA mit Essigsäure beladen. Peptische Spaltung des radioaktiven Acetyl-Enzyms lieferte ein komplexes Gemisch von $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptiden, dessen Aufspaltung nach umfangreichen chromatographischen und elektrophoretischen Trennoperationen im wesentlichen gelang. Hauptbestandteil des Peptidgemisches war ein Nonapeptid der Zusammensetzung Ala-(Gly₂, His, Thr)-Lys-(O- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl)Ser-Gln-Gly. Durch Verdauung des $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzyms mit Trypsin ließ sich die Zahl der Spaltpeptide stark reduzieren und der Trennungsgang abkürzen. Die bei pH 6,9-7,0 durchgeführte Spaltung lieferte das Octapeptid N- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Ser-Gln-Gly-Leu-Thr-Val-Ala-Val, dessen Sequenz durch stufenweisen Abbau mit Carboxypeptidase A ermittelt wurde. Als radioaktives Zwischenprodukt des Carboxypeptidase A-Abbaus wurde N- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Ser-Gln-Gly, als Endprodukt N- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-serin isoliert. Die aminoendständige Position der Essigsäure im tryptischen Peptid ließ sich als das Resultat einer O $\rightarrow$ N-Acetylmagerung erklären, die spontan nach Freisetzung des Peptids durch Trypsin am N-terminalen Serin eingetreten war. Die Reaktivität der Essigsäurereste im denaturierten $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Enzym, in den peptischen $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptiden und in der Modellverbindung Gln-(O- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl)Ser-Gly wurden untersucht. Die kinetischen Daten lieferten weitere Beweise für die Rolle der Hydroxylgruppe des Serins als Bindungsstelle der Essigsäure. Die Isolierung von N- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Ser-Gln-Gly nach Abbau des tryptischen N- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptids mit Carboxypeptidase A und nach tryptischer Spaltung des peptischen O- $[^{14}\text{C}]$ Acetyl-Peptids bewies, daß beide Peptide aus dem gleichen Bereich des Enzyms stammten. Aus diesen Ergebnissen

folgte die Teilstruktur

Enzym-Ala-(Gly₂, His, Thr)-Lys-(O-[¹⁴C]Acetyl)Ser-Gln-Gly-Leu-Thr-Val-Ala-Val-COOH

für das Acetyl-Enzym, die das Carboxylende einer Polypeptidkette des Enzyms darstellt.

Aus einem Vergleich mit der Aminosäurezusammensetzung von peroxydationsstabilen [¹⁴C]Malonyl-Peptiden ging hervor, daß die Acetyl- und Malonyl-Übertragungsreaktionen von verschiedenen Komponenten des Enzymkomplexes katalysiert werden. In beiden Fällen werden die Transferreaktionen jedoch über die Hydroxylgruppen von Serinresten abgewickelt.

E. Literaturverzeichnis

1. Lynen, F., J. cellular comparat. Physiol. 54, Suppl. 1, 53 (1959).
2. Brady, R.O., Proc.nat.Acad.Sci. USA 44, 993 (1958).
3. Wakil, S.J., J.Amer.chem.Soc. 80, 6465 (1958).
4. Wakil, S.J., u. J. Ganguly, J.Amer.chem.Soc. 81, 2597 (1959).
5. Lynen, F., S.-B. math.-naturwiss. Kl. bayer.Akad.Wiss. München, 4. März 1960.
6. Lynen, F., Federation Proc. 20, 941 (1961).
7. Lynen, F., I. Hopper-Kessel u. H. Eggerer, Biochem.Z. 340, 95 (1964).
8. Vagelos, P.R., P.W. Majerus, A.W. Alberts, A.R. Larrabee u. G.P. Ailhaud, Federation Proc. 25, 1485 (1966).
9. Hsu, R.Y., G.Wasson u. J.W. Porter, J.biol.Chem. 240, 3736 (1965).
10. Brooks, J.L. u. P.K. Stumpf, Arch.Biochem.Biophysics 116, 108 (1966).
11. Toomey, R.E., u. S.J. Wakil, J.biol.Chem. 241, 1159 (1966).
12. Bressler, R., u. S.J. Wakil, J.biol.Chem. 237, 1441 (1962).
13. Lynen, F., in M. Sela: New Perspectives in Biology, S. 132, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1964).
14. Lynen, F., Angew. Chem. 77, 929 (1965).
15. Lynen, F., in Proc. of the R.A. Welch Foundation Conferences on Chemical Research, V. Molekular Structure and Biochemical Reactions, S. 293, Houston (1961).
16. Majerus, P.W., A.W. Alberts u. P.R. Vagelos, J.biol.Chem. 240, 4723 (1965).
17. Pugh, E.L., u. S.J. Wakil, J.biol.Chem. 240, 4727 (1965).
18. Lynen, F., Biochem. J. 102, 381 (1967).
19. Lynen, F., D. Oesterhelt, E. Schweizer u. K. Willecke in: Cellular Compartmentalisation and Control of Fatty Acid Metabolism, S. 1-24, Universitetsforlaget, Oslo (1968).
20. Willecke, K., Dissertation, Universität München (1968).
21. Simoni, R.D., R.S. Criddle u. P.K. Stumpf, J.biol.Chem. 242, 573 (1967).
22. Schweizer, E., u. F. Lynen, Europ.J.Biochem., im Druck (1970).
23. Oesterhelt, D., Dissertation, Universität München (1967).
24. Lynen, F., u. K. Kirschner, unveröffentlichte Versuche.
25. Lynen, F., u. H.C. Reeves, unveröffentlichte Versuche.
26. Schweizer, E., Dissertation, Universität München (1963).
27. Hagen, A., Dissertation, Universität München (1963).
28. Seubert, W., Dissertation, Universität München (1955).

29. Oesterheld, D., H. Bauer u. F. Lynen, Proc.nat.Acad.Sci. USA 63, 1377 (1969).
30. Lynen, F., u. G. Lust, unveröffentliche Versuche.
31. Lynen, F., u. J. Ayling, unveröffentliche Versuche.
32. Bruce, T.C., u. S.J. Benkovic, Bioorganic Mechanisms, Benjamin, New York u. Amsterdam (1966).
33. Williams, A., Quart. Rev. 23, 1 (1969).
34. Koshland, D.E., u. K.E. Neet, Annu.Rev.Biochem. 37, 672 (1968).
35. Ellman, G.L., Arch.Biochem.Biophysics 74, 443 (1958).
36. Sumper, M., Dissertation, Universität München (1970).
37. Harris, J.I., B.P. Meriwether u. J. Harting-Park, Nature (London) 198, 154 (1963).
38. Legget-Bailey, J., Techniques in Protein Chemistry, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London u. New York (1967).
39. Hill, R.L., Advances Protein Chem. 20, 37 (1965).
40. Bovey, F.A., u. S.S. Yanari in P.D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes, Bd. 4, S. 63, Academic Press, New York u. London (1960).
41. Moore, S., u. W.H. Stein, J.biol.Chem. 176, 367 (1948).
42. Moore, S., u. W.H. Stein, J.biol.Chem. 211, 907 (1954).
43. Michl, H., Mh.Chem. 82, 489 (1951).
44. Lederer, M., Paper Electrophoresis, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York u. Princeton (1957).
45. Greenstein, J.P., u. M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Bd. 3, S. 2323, Wiley, New York u. London (1961).
46. Gray, W.R., u. B.S. Hartley, Biochem.J. 89, 59 P (1963).
47. Gray, W.R., in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. XI, S. 139, Academic Press, New York u. London (1967).
48. Friedman, S., u. G. Fraenkel. Arch. Biochem.Biophysics 59, 491 (1955).
49. Fritz, I.B., Acta physiol.Scand. 34, 367 (1955).
50. Fritz, I.B., Advances Lipid Res. 1, 286 (1963).
51. Bressler, R., R. Katz u. B. Wittels, Ann. New York Acad.Sci. 131, 207 (1965).
52. Hamprecht, B., persönliche Mitteilung.
53. Moore, S., u. H.W. Stein in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. VI, S. 819, Academic Press, New York u. London (1963).
54. Linneweh, W., Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 182, 8 (1929).
55. Marquis, N.R., u. I.B. Fritz, J.Lipid Res. 5, 184 (1964).
56. Spackman, D.H., W.H. Stein u. S.Moore, Analytic. Chem. 30, 1190 (1958).
57. Spackman, D.H., Federation Proc. 22, 499 (1963).

58. Lynen, F., u. R. Bruckdorfer, unveröffentlichte Versuche.
59. Gehring, U., u. J.I. Harris, FEBS Letters 1, 150 (1968).
60. Sephadex - Kurze Einführung in das Verfahren der Gelfiltration -, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala.
61. Matsubara, H., u. R.M. Sasaki, Biochem.biophysic.Res.Comm. 35, 175 (1969).
62. Edman, P., Acta chem.Scand. 4, 283 (1950).
63. Gray, W.R., in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. XI, S. 469, Academic Press, New York u. London (1967).
64. Konigsberg, W., in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. XI, S. 461, Academic Press, New York u. London (1967).
65. Smith, E.L. u. R.L. Hill in P.D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes, Bd. 4, S. 37, Academic Press, New York u. London (1960).
66. Light, A., in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. XI, S. 426, Academic Press, New York u. London (1967).
67. Hanson, H., M.D. Gläßler u. H. Kirschke, Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 340, 107 (1965).
68. Akabori, S., K. Ohno u. K. Narita, Bull.chem.Soc. Japan 25, 214 (1952).
69. Niu, C., u. H. Fraenkel-Conrat, J.Amer.chem.Soc. 77, 5882 (1955).
70. Cromwell, L.D., u. G.R. Stark, Biochemistry 8, 4735 (1969).
71. Fraenkel-Conrat, H., J.I. Harris, u. A.L. Levy, Methods biochem.Analysis 2, 359 (1955).
72. Ambler, R.P., in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. XI, S. 436, Academic Press, New York u. London (1967).
73. Neurath, H., in P.D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes, Bd. 4, S. 11, Academic Press, New York u. London (1960).
74. Reindl. F., u. W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954).
75. Wünsch, E., u. K. Deimer, unveröffentlichte Versuche.
76. Wünsch, E., u. G. Wendlberger, Chem.Ber. 101, 3659 (1968).
77. Josefson, L., Biochim. biophysica Acta 74, 774 (1963).
78. Porter, G.R., H.N. Rydon u. J.A. Schofield, J.chem.Soc. (1960), 2686.
79. Greenhalgh, R., R.M. Heggie u. M.A. Weinberger, Canad.J.Chem. 41, 1662 (1963).
80. Hansen, B., Acta chem. Scand 17, 1307 (1963).
81. Anderson, B.M., E.H. Cordes u. W.P. Jencks, J.biol.Chem. 236, 455 (1961).
82. Vallee, B.L. u. J.F. Riordan, Annu.Rev.Biochem. 38, 733 (1969).
83. Blow, D.M., J.J. Birktoft u. B.S. Hartley, Nature (London) 221, 337 (1969).
84. Wright, C.S., R.A. Alden u. J.C.S. Kraut, Nature (London) 221, 235 (1969).

85. Winnewisser, W., Diplomarbeit, Universität München (1969).
86. Oesterheld, D., persönliche Mitteilung.
87. Porter, J.W., Arch.Biochem.Biophysics, in Vorbereitung (1970).
88. Decker, K., Dissertation, Universität München (1955).
89. Gruber, W., Dissertation, Universität Frankfurt (1959).
90. Seubert, W., in H.A. Lardy: Biochemical Präparations, Bd. 7, S. 80, Wiley, New York (1960).
91. Kuhn, R., u. G. Quadbeck, Chem.Ber. 84, 844 (1951).
92. Eggerer, H., u. F. Lynen, Biochem.Z. 335, 540 (1962).
93. Eggerer, H., E.R. Stadtman u. P. Overath, Biochem.Z. 333, 1 (1960).
94. Keller, F.J., J.med.Chem. 6, 202 (1963).
95. Simon, E.J., u. D. Shemin, J.Amer.chem.Soc. 75, 2520 (1953).
96. Sakami, W., u. G. Toennis, J.biol.Chem. 144, 203 (1942).
97. Narita, K., Biochim. biophysica Acta 30, 352 (1958).
98. Bremer, J., u. K.R. Norum, J.biol.Chem. 242, 1744 (1967).
99. Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th.Bücher, R.Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt, E. u. G. Pfeleiderer, Z.Naturforsch. 8b, 555 (1953).
100. Murphy, J.B., u. M.W. Kies, Biochim.biophysica Acta 45, 382 (1960).
101. Stadtman, E.R., J.cellular comparat.Physiol. 41, 89 (1953).
102. Lynen, F., Liebigs Ann.Chem. 574, 33 (1951).
103. Buckel, W., u. H. Eggerer, Biochem. Z. 343, 29 (1965).
104. Jander, G., u. H. Wendt. Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie, S. 100, Hirzel-Verlag, Stuttgart (1959).
105. Lands, W.E.M., u. P. Hart, J.biol.Chem. 240, 1905 (1965).
106. Rudloff, V., u. G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 323, 129 (1961).
107. Benson, J.V., R.T. Jones, J. Cormick u. J.A. Patterson, Analyt. Biochem. 16, 91 (1966).
108. Richmond, V., u. B.S. Hartley, Nature (London) 184, 1869 (1959).
109. Milstein, C., u. F. Sanger, Biochem. J. 79, 456 (1961).
110. Randerath, K., Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1962).
111. Hirs, C.H.W., in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Bd. XI, S. 59, Academic Press, New York u. London (1967).
112. Seiler, N., u. M. Wiechmann, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 337, 229 (1964).
113. Wood, K.R. u. K.T. Wang, Biochim.biophysica Acta 133, 369 (1967).

Lebenslauf

Am 30. März 1940 wurde ich in Gotha/Thüringen geboren. Meine Eltern sind Rolf Ziegenhorn, Zollinspektor, und Johanna Hoppe, verw. Ziegenhorn. Mein Vater ist 1944 in Rußland gefallen.

Von 1946 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Gotha und nach der Flucht aus der sowjetischen Besatzungszone im Jahre 1954 kurze Zeit die private Oberschule in Uetze/Niedersachsen. Anschließend trat ich in die Untertertia des Realgymnasiums in Alsfeld/Oberhessen ein. Von 1956 bis 1960 war ich Schüler am Städtischen Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Köln-Mülheim, wo ich im Februar 1960 das Abitur ablegte. Nach Absolvierung eines halbjährigen Industriepraktikums bei der Firma Klöckner-Humboldt-Deutz AG., Köln, studierte ich im Wintersemester 1960/61 an der Technischen Hochschule München Maschinenbau. Im Sommersemester 1961 nahm ich das Chemiestudium an der Universität München auf und legte dort im Wintersemester 1963/64 die Diplom-Vorprüfung und im Sommersemester 1966 die Diplom-Hauptprüfung ab. Von Dezember 1966 bis Februar 1970 führte ich am Max-Planck-Institut für Zellchemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit aus.

